

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl Bakteriologie
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dipl. Chem. Jürgen Heesemann

**Entwicklung einer Multi-Epitop-Vakzine auf Basis exponierter
Peptidomänen verschiedener Virulenz-assoziiertes
Außenmembranproteine uropathogener *Escherichia coli***

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
An der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Andreas Wieser
aus München

2011

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität München**

1. Berichterstatter:

Priv. Doz. Dr. med. Sören Schubert

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. med. Alexander Karl

Prof. Dr. med. Peter Lohse

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dipl. Chem. Jürgen Heesemann

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2011

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| A EINLEITUNG..... | 1 |
| A 1. Harnwegsinfekte durch extraintestinal pathogene <i>Escherichia coli</i> (ExPEC)..... | 1 |
| A 2. Immunsystem, Überblick..... | 3 |
| A 3. Immunreaktion auf HWI..... | 8 |
| A 4. Vakzinierungen..... | 11 |
| 4.1 Allgemeines..... | 11 |
| 4.2 Die parenterale Vakzinierung..... | 12 |
| 4.3 Die mukosale Vakzinierung..... | 12 |
| 4.4 Die Typ-III-vermittelte Vakzinierung..... | 13 |
| 4.5 Bekannte Impfversuche gegen ExPEC..... | 15 |
| A 5. Zielsetzung der Arbeit..... | 15 |
| B MATERIAL UND METHODEN..... | 17 |
| B 1. Material..... | 17 |
| 1.1 Geräte..... | 17 |
| 1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien..... | 18 |
| 1.3 Puffer und Lösungen..... | 18 |
| 1.3.1 Puffer und Lösungen für die Agarose-Gel-Elektrophorese..... | 18 |
| 1.3.2 Gele, Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 19 |
| 1.3.3 Puffer und Lösungen für die Immunoblots/Western-Blots..... | 19 |
| 1.3.4 Puffer für die Proteinaufreinigung..... | 19 |
| 1.3.5 Puffer und Lösungen für die Enzym-Immunoassays..... | 19 |
| 1.3.6 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie (FACS)..... | 20 |
| 1.3.7 Puffer und Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie..... | 20 |
| 1.4 Kits..... | 20 |
| 1.5 Elektrophoresemarker..... | 21 |
| 1.6 Antikörper..... | 21 |
| 1.7 Enzyme, Proteine und Inhibitoren..... | 21 |
| 1.8 Synthetische Peptide..... | 22 |
| 1.9 Synthetische Oligonukleotide/Primer..... | 22 |

| | |
|---|----|
| 1.10 Zellbiologisch wirksame Substanzen..... | 23 |
| 1.11 Zell-Linien..... | 23 |
| 1.12 Bakterienstämme..... | 23 |
| 1.13 Nährmedien und Zusatzlösungen..... | 24 |
| 1.13.1 Nährmedien und Zusatzlösungen für die Zellkultur..... | 24 |
| 1.13.2 Nährmedien und Zusatzlösungen für die Bakterienkultur..... | 24 |
| 1.13.3 Antibiotika..... | 25 |
| B 2. Methoden..... | 26 |
| 2.1 DNA-Methoden..... | 26 |
| 2.1. 1 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)..... | 26 |
| 2.1. 2 Isolierung von Plasmid-DNA..... | 27 |
| 2.1. 3 Gewinnung chromosomaler DNA..... | 28 |
| 2.1. 4 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen..... | 29 |
| 2.1. 5 Ligation der DNA..... | 29 |
| 2.1. 6 Gel-Elektrophorese..... | 30 |
| 2.1. 7 Gen-Synthese..... | 30 |
| 2.1. 8 RNA-Strukturanalyse..... | 31 |
| 2.1. 9 DNA-Sequenzierung..... | 31 |
| 2.1.10 Elektrotransformation..... | 31 |
| 2.1.11 Ethanolpräzipitation von DNA..... | 32 |
| 2.2 Protein-Methoden..... | 32 |
| 2.2. 1 Struktur-Prädiktion..... | 32 |
| 2.2. 2 Epitop-Prädiktion..... | 34 |
| 2.2. 3 Proteasomen-Schnittmuster-Prädiktion..... | 34 |
| 2.2. 4 Proteinexpression..... | 35 |
| 2.2. 5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 36 |
| 2.2. 6 Immunoblot/Western-Blot/Dot Blot..... | 37 |
| 2.2. 7 Proteinaufreinigung mit His-Tag..... | 38 |
| 2.2. 8 TCA-Präzipitation von Überständen..... | 39 |
| 2.3 Zellkultur-Methoden..... | 40 |
| 2.3. 1 Wachstumsbedingungen, Passagieren/Splitten..... | 40 |
| 2.3. 2 Antikörperzucht mit Hybridomazellen..... | 41 |
| 2.3. 3 Kryokonservierung..... | 41 |

| | |
|---|----|
| 2.3. 4 Bestimmung der Anzahl lebender Zellen..... | 41 |
| 2.3. 5 Extrazellulärer Gentamycin-Kill-Assay..... | 42 |
| 2.3. 6 Anzucht für Immunfluoreszenz-Färbung auf Glasplättchen..... | 42 |
| 2.3. 7 Immunfluoreszenzfärbung und –mikroskopie..... | 43 |
| 2.4 Bakterien-Kulturen..... | 44 |
| 2.4. 1 Gewinnung von Bakterienkulturen definierter Keimzahl..... | 44 |
| 2.4. 2 Kryokonservierung der Bakterienkulturen..... | 44 |
| 2.4. 3 Selektion von Bakterien auf Antibiotikaresistenz..... | 44 |
| 2.4. 4 Herstellung elektrokompetenter <i>E.coli</i> und <i>Salmonella enterica</i> | 44 |
| 2.5 Immunitätsassays..... | 45 |
| 2.5.1 Antikörper-Titer-Bestimmung mittels ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)..... | 45 |
| 2.5.2 ELISpot (Enzyme-Linked Immuno Spot) Assay..... | 45 |
| 2.5.3 FACS-Messung mit Miltenyi Catch Assay, CD4- und CD8-Zellen... | 47 |
| 2.5.3.1 Stimulation der Zellen..... | 47 |
| 2.5.3.2 MACS-Aufreinigung IFN- λ -sezernierender Zellen..... | 50 |
| 2.5.3.3 Färbung der T-Zellen nach CD4 und CD8..... | 50 |
| 2.5.3.4 FACS-Messung der IFN- γ sezernierenden Zellen..... | 50 |
| 2.6 Tierexperimentelle Methoden..... | 51 |
| 2.6. 1 Applikation von Impfsalmonellen mittels Schlundsonde..... | 51 |
| 2.6. 2 Intranasale Immunisierung..... | 52 |
| 2.6. 3 Nullblutabnahme..... | 52 |
| 2.6. 4 Vaginallavage..... | 52 |
| 2.6. 5 Uringewinnung..... | 52 |
| 2.6. 6 Töten der Versuchstiere..... | 53 |
| 2.6. 7 Haltung der Versuchstiere nach Vakzinierung..... | 53 |
| 2.6. 8 Intraperitoneales, subcutanes und intramuskuläres Spritzen..... | 53 |
| 2.6. 9 Peritonitis-Infektionsmodell..... | 54 |
| 2.6.10 Finale Blutabnahme..... | 54 |
| 2.6.11 Organentnahme zur Keimzahlbestimmung und Milzzellen- gewinnung..... | 54 |
| 2.7 Statistische Analysen..... | 55 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| C | ERGEBNISSE..... | 56 |
| C 1. | Entwicklung der Impfproteine..... | 56 |
| 1.1 | Virulenzfaktorenauswahl anhand von Microarray-Daten..... | 56 |
| 1.2 | Simulation der dreidimensionalen Struktur der Proteine mit Hilfe computergestützter Algorithmen..... | 57 |
| 1.3 | Simulation der MHC-I- und MHC-II-Epitope sowie des Proteasomenschnittmusters, optimiert für die Balb/C-Maus in den Aminosäuresequenzen der Proteine..... | 60 |
| 1.4 | Ermittlung und Optimierung der Gensequenz für die Multi-Epitop- Proteine Vol1 und Vol2..... | 62 |
| C 2. | Proteinexpression im bakteriellen System..... | 65 |
| C 3. | Proteinexpression und Translokation mittels Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) von <i>Salmonella enterica</i> S. Typhimurium..... | 67 |
| C 4. | Vakzinierung im Mausmodell..... | 75 |
| 4.1 | Vakzinierung der Maus mit <i>Salmonella</i> -Impfstamm..... | 76 |
| 4.2 | Intranasale Vakzinierung der Maus..... | 80 |
| 4.3 | Intramuskuläre Vakzinierung der Maus..... | 81 |
| C 5 | Untersuchung der Immunantwort..... | 82 |
| 5.1 | Untersuchung der Immunantwort nach T3SS-abhängiger Immunisierung..... | 83 |
| 5.1.1 | Antikörper in Blut und Vaginallavage..... | 83 |
| 5.1.2 | Zelluläre Immunantwort..... | 86 |
| 5.2 | Untersuchung der Immunantwort nach intranasaler Vakzinierung..... | 89 |
| 5.2.1 | Antikörper in Blut und Vaginallavage..... | 89 |
| 5.2.2 | Zelluläre Immunantwort..... | 93 |
| 5.3 | Untersuchung der Immunantwort nach intramuskulärer Vakzinierung... | 97 |
| 5.3.1 | Antikörper in Blut und Vaginallavage..... | 97 |
| 5.3.2 | Zelluläre Immunantwort..... | 97 |
| C 6. | Challenge-Schutzwirkung..... | 97 |
| 6.1 | Schutzwirkung nach intranasaler Vakzinierung..... | 98 |
| 6.2 | Schutzwirkung nach T3SS-abhängiger Immunisierung..... | 100 |

| | |
|---|------------|
| D DISKUSSION..... | 102 |
| D 1. Einführung, Ziele der Arbeit..... | 102 |
| D 2. Eigene Resultate..... | 103 |
| D 3. Einsatzfähigkeit in Human- und Tiermedizin..... | 111 |
| D 4. Ausblick..... | 113 |
| E ZUSAMMENFASSUNG..... | 115 |
| F LITERATURVERZEICHNIS..... | 117 |
| G ABKÜRZUNGEN..... | 125 |
| DANKSAGUNG..... | 130 |
| LEBENS LAUF..... | 131 |
| ANHANG..... | 135 |
| I. Protein-Struktur und Proteasomenschnittmuster..... | 135 |
| II: Sequenzanalyse des synthetischen Gens..... | 144 |
| III: Gensequenzen der synthetischen Gene..... | 146 |

A EINLEITUNG

A 1. Harnwegsinfekte durch extraintestinal pathogene *Escherichia coli* (ExPEC)

Extraintestinal pathogene *Escherichia coli* (ExPEC) sind *E. coli*-Stämme, die sich auf Infektionen außerhalb des Verdauungstraktes spezialisiert haben. Sie verursachen ein großes Spektrum verschiedenster Infektionen wie Sepsis, Neugeborenen-Meningitis, Peritonitis oder Harnwegsinfekte und sind für eine signifikante Sterblichkeit verantwortlich, besonders bei Patienten im Krankenhaus.

Die bedeutendsten Erkrankungen, die durch ExPEC hervorgerufen werden, sind die Harnwegsinfekte (HWI). Sie stellen in Europa und auf dem nordamerikanischen Kontinent mit geschätzten 150 Mio. Fällen pro Jahr die häufigste Infektion überhaupt dar.

Etwa die Hälfte aller Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens mindestens einmal an einem HWI, der zu 80-85 % von ExPEC verursacht wird (Kucheria et al. 2005). Ebenfalls häufig sind HWI bei älteren Menschen, wobei dann auch vermehrt Männer betroffen sind. Außerdem sind ExPEC verantwortlich für die meisten Urosepsis Fälle und verursachen so eine erhebliche Anzahl von Todesfällen, vor allem von Älteren, Kleinkindern und hospitalisierten oder immungeschwächten Patienten.

Die Behandlung dieser Erkrankungen stellt mit über 6 Mrd. Dollar direkter Gesundheitskosten pro Jahr allein in den USA eine große Belastung für das Gesundheitssystem dar. Die Behandlung ist auch zunehmend schwierig, da die verursachenden Keime seit Jahrzehnten kontinuierlich mehr Resistenzen gegenüber Antibiotika entwickeln. So ist in manchen Regionen zum Beispiel in Kasachstan eine nahezu vollständige Resistenz gegen Ciprofloxacin bei ExPEC (Svanborg, persönl. Mitteilg.) zu beobachten und es wird immer schwieriger ein Antibiotikum zu finden, das bei kalkulierter Therapie eine Wirksamkeit bei über 70 % der Stämme erreicht.

Erschwerend kommt hinzu, dass manche ExPEC-Stämme bei Infektionen in die Urothelzellen eindringen können und dort in kleinen Kolonien überdauern, die sogar gegen in vitro gut wirksame und gewebeängige Substanzen wie Ciprofloxacin offensichtlich nahezu unempfindlich sind. Vermutlich ist dieser Invasionsmechanismus neben den immer wiederkehrenden Schmierinfektionen mit Stämmen aus der eigenen Fäkalflora die Ursache für den oft rekurrenten Verlauf der HWI.

Obwohl Harnwegsinfektionen von Patienten als sehr unangenehm empfunden werden, sind sie noch relativ harmlos, solange sie auf den unteren Harntrakt beschränkt bleiben. Es kann sich jedoch, ausgehend von einer Blasenentzündung (Cystitis) eine aufsteigende Infektion mit

Beteiligung der Nierenbecken (Pyelonephritis) entwickeln. Diese Pyelonephritiden gehen nicht nur mit einer viel massiveren Symptomatik für den Patienten einher, sondern können auch ernsthafte Komplikationen wie Sepsis oder Niereninsuffizienz zur Folge haben.

Nicht alle *E. coli*-Stämme jedoch sind in der Lage, beim Immunkompetenten derartige Krankheitsbilder auszulösen. Dazu benötigen sie bestimmte Virulenzfaktoren (VF), die sie von den harmlosen Kommensalen der residenten Stuhlflora des Menschen unterscheiden und es ihnen ermöglichen, die unspezifischen Abwehrmechanismen des Wirts zu überwinden und sich in Nischen wie etwa dem Urogenitaltrakt anzusiedeln. Zu den ExPEC spezifischen VF gehören neben Toxinen auch Adhäsine und Pili, die die Anheftung an das Urothel auch bei starker Strömung erlauben. Von besonderer Bedeutung für ExPEC sind ebenfalls verschiedenste Eisenaufnahmesysteme (Siderophorsysteme), die es den Bakterien ermöglichen, das für ihren Stoffwechsel essentielle und vom Körper daher als Schutzmechanismus verknappte Eisen aufzunehmen (s. **Abb. 1**). Dazu kommen noch Flagellen, mit denen die Bakterien sich fortbewegen und gezielt chemotaktisch gesteuert gute Nischen aufsuchen, sowie Serum Resistenzproteine und Polysaccharidkapseln, die helfen, die Bakterien vor Angriffen des Immunsystems zu schützen (Johnson 1991). Seit kurzem konnte

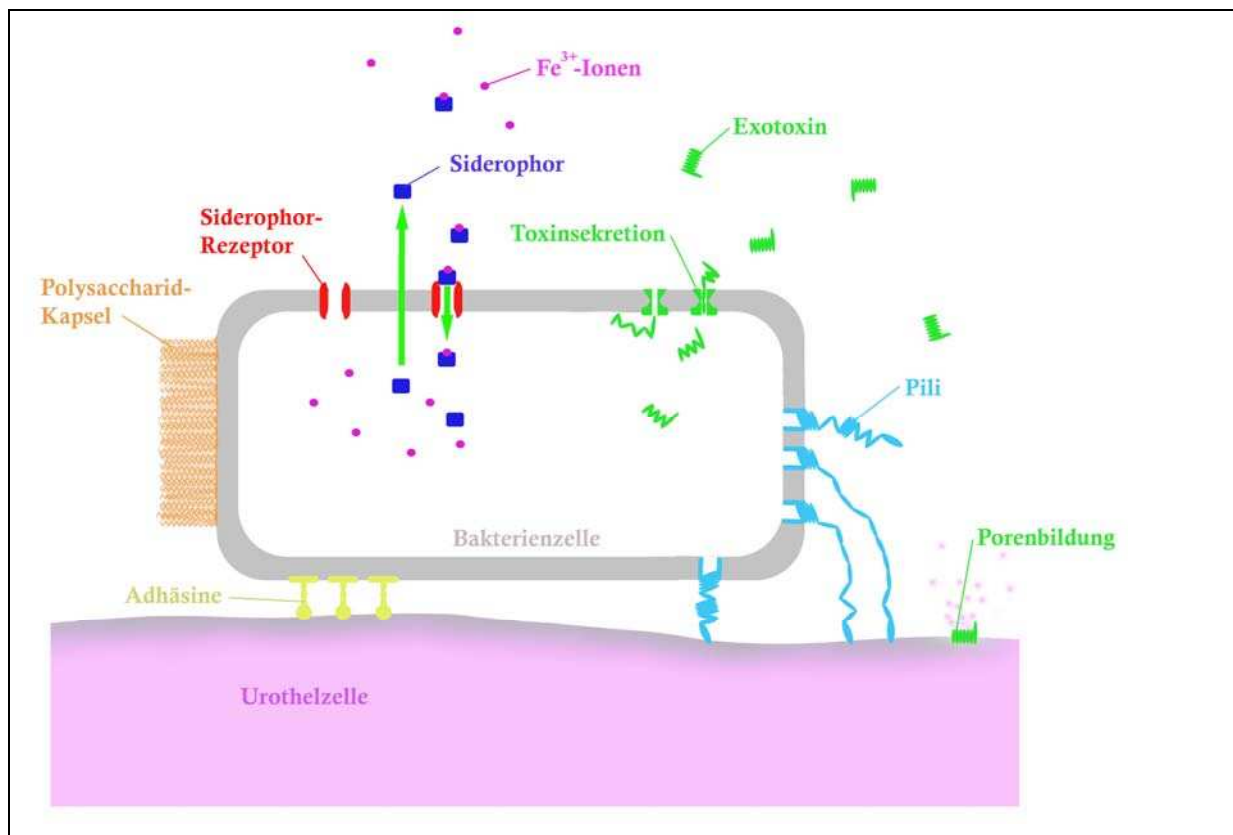


Abb. 1: Schema wichtiger Virulenzfaktoren von ExPEC

Siderophorsystem: als Beispiel FyuA-/Yersiniabactinsystem; **Exotoxin:** als Beispiel HlyA/ α -Hämolysin; **fimbrielle Adhäsine:** z.B. P-Pili; **afimbrielle Adhäsine:** z.B. Dr.-Adhäsine; **Polysaccharidkapsel**

von unserer Forschungsgruppe in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität in München (TUM) ein weiterer sezernierter Virulenzfaktor beschrieben werden, der in der Lage ist während der Infektion die TLR Signalwege des Wirtes lahm zu legen (Cirl 2008).

A 2. Immunsystem, Überblick

Das Immunsystem des Körpers stellt ein hoch spezialisiertes System an interagierenden Zellpopulationen dar, die hauptsächlich dem Schutz gegen Krankheitserreger dienen. Man unterscheidet dabei das angeborene, unspezifische System und das adaptive, lernfähige System.

Das angeborene System ist phylogenetisch erheblich älter und bildet eine jederzeit einsatzbereite erste Barriere gegen eindringende Krankheitserreger. Es umfasst nichtzelluläre Schutzmechanismen, wie den Säureschutzmantel der Haut, ebenso wie lösliche Faktoren z.B. im Blut das Komplementsystem, Lysozym in der Tränenflüssigkeit bzw. im Urin oder Defensine im Darm. Wichtig sind auch unspezifische Mediatoren des Immunsystems wie Interferone und Interleukine und regulatorische Faktoren wie Chemokine oder Zytokine.

An Zellen sind in erster Linie die Granulozyten und Mitglieder des Monozyten-Makrophagen-Systems sowie die natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) zu nennen.

Die Trennung zwischen unspezifischem (angeborenen) und spezifischem (erworbenen) Immunsystem ist nicht so scharf, initiieren und modulieren sich beide Systeme doch in entscheidendem Maße gegenseitig. So sind die Zellen des angeborenen Systems mittels „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs) auch in der Lage, spezifisch hoch konservierte Moleküle von Mikroorganismen zu erkennen, so genannte „microbial/pathogen associated molecular patterns“ (M/PAMPs). (Aderem & Ulevitch, 2000). Sind auf diese Art Erreger erkannt, entsteht eine Entzündungsreaktion und die sofortige Bekämpfung der Erreger, hauptsächlich durch Phagozytose, wird eingeleitet. Bei diesem Vorgang werden durch Phagozyten Bruchstücke der aufgenommenen Erreger wieder auf speziellen Oberflächenmolekülen, den MHC-Komplexen (Major-Histo-Compatibility), präsentiert und stehen damit dem adaptiven Immunsystem zur Verfügung.

Das adaptive Immunsystem tritt erst bei Wirbeltieren auf und ist so entwicklungsgeschichtlich erheblich jünger. Anders als das unspezifische Immunsystem ist es jedoch in der Lage, spezifisch gegen einzelne, fremde Antigene zu reagieren und ein Gedächtnis auszubilden, das

es erlaubt, eine länger dauernde Immunität gegen einen Krankheitserreger zu entwickeln. Es kommt dann bei Zweitkontakt mit dem Pathogen sehr schnell zu einer massiveren Abwehrreaktion.

Die dabei wichtigsten Zellen sind die B- und T-Lymphozyten, die auf ihrer Oberfläche je eine charakteristische Art von Rezeptor tragen. Diese Rezeptoren haben eine Antigenbindestelle, die durch Gen-Umlagerungen während der Reifung der B- oder T-Zelle eine für die einzelne Zelle charakteristische Sequenz und damit auch Form annimmt. Die Möglichkeiten sind dabei außerordentlich vielfältig, sodass nahezu jedes denkbare Epitop (antigene Determinante, von gr. *épi* auf, an, und *tópos* Ort) erkannt werden kann. Der Hauptunterschied zwischen dem B- und dem T-Zellrezeptor ist dabei, dass Ersterer das native Antigen über membranständige IgM und IgD Monomere binden, Letzterer aber nur das auf einem MHC-Rezeptor präsentierte prozessierte Antigen erkennen kann.

Die B-Zellen die zu Plasmazellen ausreifen sowie die von ihnen produzierten Antikörper repräsentieren die humorale Seite der adaptiven Immunantwort, wohingegen die T-Zellen der zellulären Seite zugeordnet werden.

Die B-Lymphozyten entstehen und reifen beim Säuger im Knochenmark. Danach verteilen sie sich im Körper und können mit ihren oberflächenständigen Rezeptoren (B-Zellrezeptoren) Antigene binden und phagozytotisch aufnehmen. Die so aufgenommenen Proteine werden nach dem Verschmelzen des Phagosoms mit Lysosomen zum Endolysosom, durch Proteasen zu Peptidbruchstücken abgebaut und die passenden werden auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen. Letztere werden nun exozytotisch auf die Zelloberfläche zurückgeführt und den T-Helferzellen präsentiert.

Diese können, so es sich bei dem präsentierten Peptid um ein Antigen handelt und die T-Helfer Zelle einen T-Zellrezeptor passender Spezifität besitzt, die B-Zelle aktivieren. Dies geschieht durch Interaktion des CD40-Liganden auf der Oberfläche der T-Zelle mit dem CD40-Rezeptor auf der B-Zelle und Ausschüttung von Interleukin 4 (IL-4) durch die T-Helferzelle.

Eine aktivierte B-Zelle teilt sich erst massiv (klonale Expansion) und differenziert sich dann in B-Plasmazellen, die Antikörper produzieren, und B-Gedächtniszellen, die langlebigen B-Zellen, die noch Jahre später bei einer erneuten Infektion sofort proliferieren und eine rasche Immunglobulin-Produktion ermöglichen.

Bei den Antikörpern unterscheidet man fünf verschiedene Klassen, IgM, IgG, IgA, IgE und IgD. Bei einer primären Antikörperantwort wird immer das pentamere IgM gebildet, das 10 Antigenbindestellen und eine starke Komplementaktivierungsfähigkeit besitzt. Später kommt es dann durch verschiedene Zytokine, die hauptsächlich von T-Helferzellen ausgeschüttet werden, zum Isotypenswitch, also zum Austausch des c-terminalen Teils der „Schweren Kette“ des Antikörpers ohne Änderung der Spezifität der Epitopbindestelle vorgegeben durch die „Leichte Kette“ und den N-terminalen Teil der „Schweren Kette“. Auf diese Weise entstehen bis zu vier Subklassen von IgG (beim Menschen IgG₁ bis IgG₄ bei der Maus IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃), sowie zwei Subklassen von IgA (IgA₁ und IgA₂ beim Menschen, aber nur eine Subklasse IgA bei der Maus) sowie die IgE und IgD Antikörper.

Die mengenmäßig bedeutendste Klasse im Serum stellt IgG dar, ein monomere Antikörper, der zur Komplementaktivierung fähig ist und mit 21 Tagen die längste Serumhalbwertszeit aller Antikörper besitzt. Jedoch sind Antikörper dieser Klasse nur in relativ geringer Menge in Sekreten anzutreffen. Dort dominieren die Antikörper der Subklasse IgA. Sie werden zunächst als monomere Form produziert und finden sich so auch im Serum.

Daneben gibt es auch eine dimere Form von IgA, bei der zwei IgA-Monomere durch die verbindende J-Chain vernetzt sind. Diese dimeren IgA werden von Poly-Ig-Rezeptoren basal an Epithelzellen gebunden und transzytotisch durch das Epithel ins Lumen hindurchgeschleust. Dabei kommt es beim Poly-Ig-Rezeptor zur enzymatischen Abspaltung der IgA-Bindungsdomäne (sekretorische Komponente), die am dimeren IgA verbleibt und diesen vermutlich in den Sekreten des Lumens vor schnellem proteolytischem Abbau schützt. Der so entstandene Antikörper wird als sIgA (soluble Immunglobulin A) bezeichnet und spielt die Hauptrolle bei der Neutralisierung von auf Schleimhäuten auftreffenden Krankheitserregern wie etwa ExPEC im Harntrakt. sIgA-Antikörper sind jedoch weder in der Lage, das Komplementsystem zu aktivieren, noch nennenswert zur Opsonierung beizutragen. Ebenfalls wichtig bei der Immunreaktion an der Epithelgrenzzone sind IgE Antikörper. Sie spielen eine Rolle beim Schutz vor Parasiten und bei der Entstehung von allergischen Reaktionen vom Soforttyp. Die IgE Antikörper sind nicht zur Komplementaktivierung befähigt, binden aber hoch affin an IgE-Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten, wo es nach Quervernetzung zur sofortigen Aktivierung und Degranulierung der Mastzelle (und subsequenter Histaminfreisetzung etc...) kommt.

Über Funktion von IgD, ist noch wenig bekannt. Diese ebenfalls monomere Form tritt nicht in hohen Konzentrationen im Blut auf und ist weder zur Komplementaktivierung noch zur

Opsonierung befähigt. IgM und IgD kommen membranständig als Antigenrezeptoren von B-Zellen vor.

Die T-Zellen stellen den zellulären Zweig der spezifischen Immunreaktion dar. Man unterscheidet dabei T-Helferzellen, die auf ihrer Oberfläche den Hilfsrezeptor CD4 tragen, und die CD8 tragenden Zytotoxischen T-Zellen.

Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt hauptsächlich durch antigenpräsentierende Dendritische Zellen (DC). Diese präsentieren auf ihrer Oberfläche endogene (aus dem Zytoplasma stammende) und im Falle der Kreuz-Präsentation auch exogene (von außen aufgenommene) Antigene auf dem MHC-Klasse-I-Rezeptor. Dieser kann von T-Zellrezeptoren passender Spezifität erkannt und gebunden werden.

Nach der Aktivierung erfolgt eine massive klonale Expansion der T-Zellen. T-Helferzellen (CD4-positiv) werden bei Immunisierungen sehr häufig aktiviert, wohingegen die spezifische Aktivierung von Zytotoxischen T-Zellen (CD8-positiv) nicht immer erreicht werden kann. Zur Aktivierung von CD8-positiven Zellen muss gleichzeitig eine CD4-positive T-Helferzelle an der antigenpräsentierenden Zelle gebunden haben, danach kommt es analog zur T-Helferzelle zur Aktivierung und Expansion der Zytotoxischen T-Zelle.

Bindet eine T-Helferzelle, kommt es zu verstärkter Expression von CD40-Liganden, der mit dem CD40-Rezeptor auf der Oberfläche der Dendritischen Zelle interagiert. Dies hat eine Hochregulation der B7-Rezeptoren und deren Wechselwirkung mit den CD28-Molekülen auf der T-Zelloberfläche zur Folge. Nach diesem dritten Stimulus folgt eine massive klonale Expansion der aktivierten T-Zelle.

Zytotoxische T-Zellen (CD8-positiv) haben einen komplexen Aktivierungsmechanismus. Sie benötigen eine sehr starke Expression von B7 auf der Oberfläche der Dendritischen Zelle. Dies ist vor allem dann möglich, wenn neben der CD8-positiven Zelle gleichzeitig eine CD4-positive T-Helferzelle an der antigenpräsentierenden Zelle gebunden hat (s. **Abb. 2b**).

Danach kommt es wie bei der T-Helferzelle zur Aktivierung und Expansion der zytotoxischen T-Zelle.

Es unterscheiden sich die Aufgaben der CD4- und der CD8-positiven T-Zellen im Zuge einer Immunantwort.

Helferzellen (CD4+) der Subklasse TH1 wirken in erster Linie entzündungsfördernd und verbessern unter anderem durch Sekretion von IFN- γ das „killing“ der Makrophagen, die dadurch vor allem Bakterien effektiver bekämpfen können.

T-Helferzellen der Subklasse TH2 dagegen wirken in erster Linie auf die Differenzierung der B-Lymphozyten ein und steuern je nach Bedarf den Isotypenwechsel der Immunglobuline. Dies geschieht mittels IL4 hin zu IgE bei parasitären Erkrankungen oder durch IL5 in Richtung IgA bei Infektionen der Schleimhäute. Zusätzlich wirken sie durch IL-10 und TGF- β antiinflammatorisch.

Die zytotoxischen T-Zellen (CD8+) bekämpfen dagegen direkt Zellen, in deren Inneren eine Vermehrung von Krankheitserregern stattfindet. Bei diesen intrazellulären Erregern werden in der Regel Peptidfragmente auf MHC-I-Komplexen auf der Zelloberfläche der befallenen Zelle präsentiert. Kann eine T-Killerzelle mit ihrem T-Zellrezeptor das passende Peptid auf dem MHC-I-Rezeptor der Gewebezelle binden, so erkennt sie spezifisch diese Körperzelle als infiziert.

Infizierte Körperzellen werden durch die T-Killerzelle zum programmierten Zelltod (Apoptose) gebracht. Dies geschieht entweder durch Wechselwirkung zwischen dem Fas-Liganden auf der T-Zelle und dem Fas-Rezeptor, welcher über eine intrazelluläre Kaskade in der Zielzelle die Apoptose einleitet oder über den Perforin-Granzym-Weg. Bei diesem wird Perforin von der T-Zelle freigesetzt und bildet Poren in der Membran der infizierten Zielzelle. Diese ermöglichen den ebenfalls freigesetzten Granzymen (Serin-Proteasen) in die Zielzelle einzudringen. Durch die Granzymwirkung und die ansteigenden Ca^{2+} -Spiegel durch die Poren des Perforins kommt es zu einer Kaskadenreaktion, die zur Zerstörung der Zielzell-DNA führt und die Apoptose bewirkt.

Ursprünglich wurde postuliert, dass zytoplasmatische Proteinformen ausschließlich auf MHC-I und alle phagozytotisch aufgenommenen Peptide auf MHC-II präsentiert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass vor allem professionelle antigenpräsentierende Zellen auch dazu in der Lage sind, Antigene, die sie über Phagozytose aufgenommen haben, auf MHC-I zu präsentieren (Rock et al. 1990, Boes et al. 2009), ein Phänomen, das als „Cross“-Präsentation bezeichnet wird (s. **Abb. 2a**).

Wie es genau zur „Cross“-Präsentation, also der Präsentation von eigentlich in Phagosomen befindlichen Proteinformen auf MHC-I-Rezeptoren, kommen kann, ist noch nicht abschließend geklärt. Klassisch erfolgt die Beladung der MHC-I-Rezeptoren im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) mittels TAP-Transportern (transporter associated with antigen processing) dorthin verbrachten Antigenen aus dem Zytoplasma. Ein Konzept besagt, dass es Möglichkeiten für Proteinbruchstücke gibt, aus den Phagosomen und Endolysosomen ins Zytoplasma zu entkommen und dort nach weiterem Abbau durch das Proteasom, analog zu den zytoplasmaständigen Epitopen, ins ER transportiert zu werden. Das Konzept der

„Cross“-Präsentation kann erklären, warum es durchaus möglich ist, mit einfachen Proteinantigenen Antwort mit Zytotoxischen T-Zellen auszulösen (Ramirez et al. 2004).

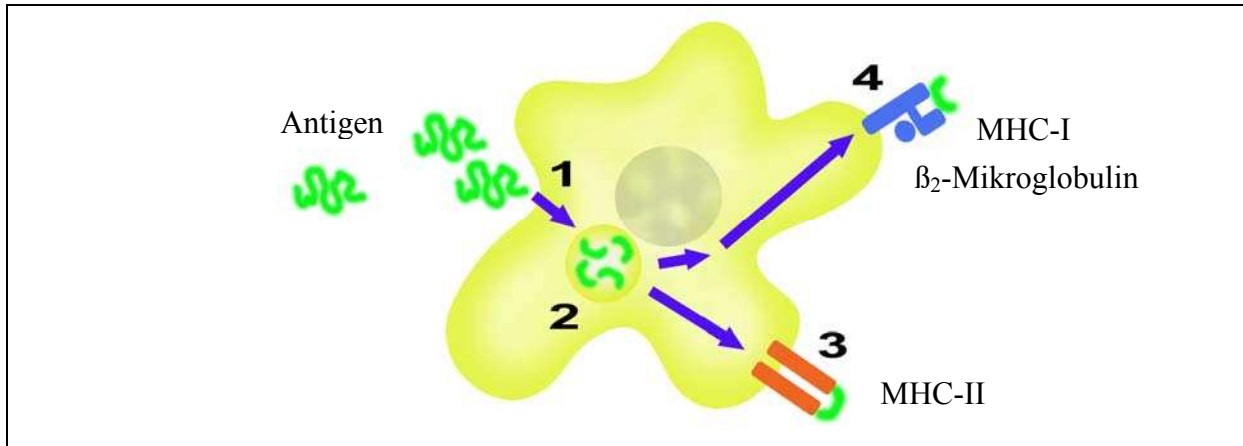


Abb. 2a: Präsentation von Fremdantigenen durch eine antigenpräsentierende Zelle (APC), hier in gelb dargestellt. 1: Endozytose/Phagozytose des Antigens; 2: Abbau im Phagolysosom; 3: Klassischer Präsentationsweg auf MHC-II; 4: „Cross“-Präsentation auf MHC-I

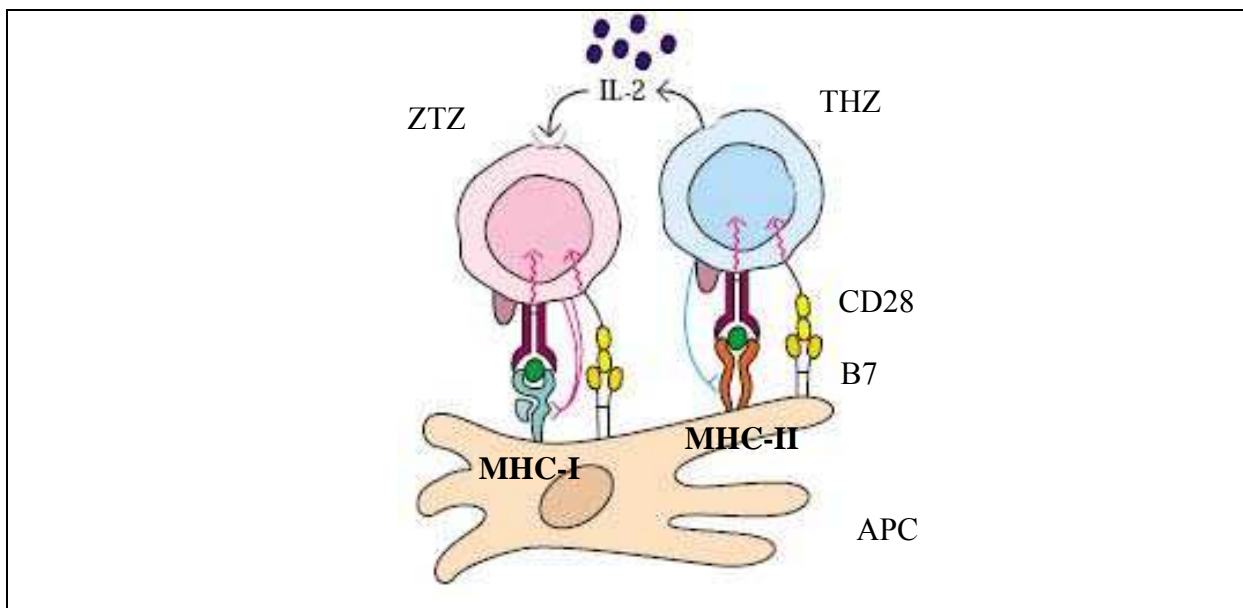


Abb. 2b: Klassische Aktivierung von Zytotoxischen T-Zellen (ZTZ) an einer Antigenpräsentierenden Zelle (APC). Co-Aktivierung durch die Rezeptor Interaktion B7-CD28; Ausschüttung von IL-2 als costimulatorischen Faktor durch die T-Helferzelle (THZ). Antigenpräsentation je durch MHC-I oder MHC-II. Modifiziert nach: Kuby Immunology 2006

A 3. Immunreaktion auf HWI im Rahmen von *E. coli* Infektionen

Wie in anderen Hohlorganen bildet das Epithel der Harnwege eine Barriere zwischen der Umwelt und dem Gewebe. Trotzdem nimmt das Urothel (Blase, Urether, proximale Urethra) dadurch eine Sonderstellung ein, dass es an ein mit der Umwelt in kontinuierlicher Verbindung stehendes Kompartiment grenzt, das physiologisch steril ist. Deshalb kommt das

Urothel nur in Ausnahmefällen in Kontakt mit Mikroorganismen. So initiieren Bakterienbestandteile am Urothel eine starke Immunreaktion unter anderem durch aktive Zytokinsekretion. Zuerst kommt es zu einer vor allem lokalen IL-8- und nachfolgenden IL-6-Sekretion durch das Urothel. Dies bewirkt nicht nur die Akute-Phase-Reaktion, sondern durch das IL-8 auch eine chemotaktisch induzierte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten (Roitt et al. 1996) mit Transmigration ins Lumen (Agace et al. 1993; Ko et al. 1993).

Deshalb ist die Pyurie, also das Auftreten von Leukozyten im Urin, bei Infektion schon früh nachzuweisen. Es gibt Hinweise, dass die Granulozyten und Makrophagen erst phagozytotisch aktiv werden, wenn die Bakterien bereits begonnen haben, in die Urothelzellularlage einzudringen (Orikasa & Hinman 1977).

Neben der Einwanderung von Phagozyten kommt es durch die Reizung des Urothels auch zur Abschilferung der oberflächlichen Zellen, um intrazelluläre Erreger mitsamt den Zellen auszuwaschen.

Besteht die Infektion länger, wird eine Reaktion des adaptiven Immunsystems unter Beteiligung der B- und T-Zellen ausgelöst. Interessanterweise bleibt die Immunreaktion jedoch bei Infekten des unteren Harntrakts hauptsächlich lokal und wird erst bei Mitbeteiligung anderer anatomischer Strukturen, etwa des tiefen Bindegewebes, unter dem Urothel oder der Niere generalisiert.

Gestützt auf Versuche an Kaninchen galt bis in die 70er Jahre die Lehrmeinung, dass ein Harnwegsinfekt im wesentlichen zu einer spezifischen IgG Antwort führt. Dabei ist die Abwehr der Infektion nicht an den Beginn der spezifischen IgG-Bildung gebunden, sondern wird der spezifischen sIgA-Antwort zugeschrieben (Hopkins et al. 1987). Dies haben auch Ergebnisse am HWI-Infektionsmodell von Makaken gezeigt, wo Harnwegsinfekte mit dem Auftreten von spezifischen sIgA, also dem löslichen, lokal produzierten Dimer aus Antikörpern der Subklasse A, ausheilen.

Dieser Zusammenhang wurde schon Anfang der 70er Jahre auch für den Menschen postuliert (Uehling & Steihm 1971), was dadurch gestützt wird, dass Kinder mit rekurrenten HWI niedrigere sIgA-Spiegel aufwiesen als üblich (Fliedner et al. 1986).

Alleine bewirken sIgA aber keinen Schutz gegen HWI, denn auch Menschen mit Immundefizienz, etwa komplett ohne IgA (selektiver Immunglobulin-A-Mangel), leiden nicht viel häufiger an HWI als immungesunde (Kaufman et al. 1970).

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass T-Zell-defiziente Mäuse anfälliger für ein Auftreten von Harnwegsinfekten sind, und dass T-Zellen eine Rolle in der Resistenz gegen HWI spielen (Jones-Carson et al. 1999, Roberts 1999).

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die ExPEC, die früher für streng extrazelluläre Erreger gehalten wurden, doch in der Lage sind in Urothelzellen einzudringen. Erste Hinweise gab es, als gezeigt werden konnte, dass bei rekurrentem Verlauf eines HWI in bis zu 68 % der Fälle der Erreger des Rezidivs identisch ist mit dem Erreger der Erstinfektion (Brauner et al. 1992). Außerdem konnte tägliche Reinigung periurethraler und perianaler Regionen mit antibiotikahaltigen Lösungen das erneute Auftreten des HWI nicht verhindern (Cantey 1985). Hieraus wurde geschlossen, dass eine wiederholte Schmierinfektion aus der Fäkalflora als Infektionsursache unwahrscheinlich ist.

Dies und die Tatsache, dass aus Blasenbiopsaten von erfolgreich behandelten Patienten mit sterilem Harn die Anzucht der Erreger möglich war, legten nahe, dass die Bakterien nicht nur intrazellulär persistieren, sondern dort sogar einer Antibiotikatherapie erfolgreich widerstehen können (Elliott et al 1998).

Im Mausmodell konnte inzwischen neben der Persistenz der Bakterien auch das erneute Auftreten einer Infektion durch Freisetzen der *E. coli* aus den Harnwegszellen gezeigt werden (Mulvey et al. 2001, Schilling et al. 2002). Offenbar können die ExPEC in die terminal ausdifferenzierte oberflächliche Urothelzellschicht eindringen und sich dort sogar schnell vermehren. Dabei bilden sie in Vacuolen der Wirtszelle so genannte IBCs, intracellular bacterial communities (intrazelluläre Bakteriengemeinschaften). Von dort aus können sie, oft im filamentösen Stadium, benachbarte, auch tiefer liegende Zellen infizieren. Sie sind außerdem in der Lage, so genannte QIRs, quiescent intracellular reservoirs (ruhende intrazelluläre Reservoirs), zu bilden, die als kleine rosettenförmige Anordnungen von Bakterien in späten Endosomen imponieren. Bakterien in QIRs können lange in Urothelzellen überdauern ohne eine entzündliche Reaktion des Wirtes auszulösen, oder erfolgreich durch Antibiotika behandelbar zu sein (Mysorekar & Hultgren 2006).

ExPECs können aus dem intrazellulären Raum (QIRs) Monate später erneut freigesetzt werden und einen HWI verursachen.

Durch die intrazelluläre Lokalisation der Bakterienkolonien spielen Antikörper also vornehmlich bei der Abwehr einer akuten Infektion oder einer kompletten Neuinfektion eine bedeutende Rolle. Für die Immunabwehr eines recurrenten HWI rückt die T-Zellen-Antwort zunehmend mehr ins Licht, da sie möglicherweise besser geeignet ist, diese Erreger im intrazellulären Stadium wirkungsvoll zu bekämpfen.

A 4. Vakzinierungen

4.1 Allgemeines

Bereits vor dem 18. Jahrhundert gab es in China, Indien, Afrika und dem Orient die ersten Versuche, Immunität gegen die Pocken durch frühe Formen der Impfung zu erlangen. Es war schon bald aufgefallen, dass derjenige, der eine Infektion bereits überlebt hatte, die Krankheit kein zweites Mal bekam. So lag es nahe, die Infektion künstlich herbeizuführen und damit einen dauerhaften Schutz zu erreichen. Bei den Pocken wurde dieses Verfahren damals als „Inokulation“ oder „Variolation“ bezeichnet und führte, wenn die folgende Infektion harmlos verlief, auch zuverlässig zu einem Schutz vor einer erneuten Infektion. Jedoch war die Letalität mit etwa 4 % relativ hoch und es bestand stets die Gefahr einer Ansteckung, da der Geimpfte hochinfektiös war.

Später entwickelte der englische Arzt Edward Jenner (1749-1823) das Verfahren weiter, ausgehend von der Beobachtung, dass auch eine harmlose Kuhpockeninfektion vor der Ansteckung mit den gefährlichen Menschenpocken schützte. 1796 kam es erstmals bei einem gesunden Probanden zur Anwendung und schützte in der Folgezeit ohne die hohe Rate an Todesfällen, wie sie bei der klassischen Inokulation beobachtet wurden, die Geimpften vor einer Pockeninfektion. Dieses Verfahren der Immunisierung wurde als „Vakzination“ bezeichnet, einem Begriff der noch heute Synonym für „Impfung“ gebraucht wird. Alle diese Versuche erfolgten rein empirisch und waren erfolgreich, ohne dass der Mechanismus der Immunantwort und des Impfschutzes auch nur ansatzweise erklärt werden konnte.

Der Einsatz von abgeschwächten oder abgetöteten Krankheitserregern zur Impfung ist heute noch üblich, etwa bei der Varizellen-Impfung oder der zellulären Pertussis-Vakzine. Die zunehmenden Erkenntnisse über die Funktion des Immunsystems ermöglichen heutzutage aber ausgereifere Ansätze, die die Wirksamkeit des Schutzes weiter steigern und die Häufigkeit und Schwere von Nebenwirkungen verringern können.

Mehr und mehr kommen Impfstoffe etwa aus aufgereinigten Proteinen, gemischt mit immunstimulatorischen Substanzen, so genannten Adjuvanzen, zum Einsatz.

Bei den Proteinen handelt es sich meist um einzelne bekannte, wichtige Virulenzfaktoren (z.B. Toxine) oder immundominante Oberflächenproteine von Erregern, die, so notwendig, attenuiert wurden und, intramuskulär injiziert, die Produktion spezifischer Antikörper induzieren können. Nach diesem Prinzip funktionieren z.B. die erfolgreich eingesetzten Impfstoffe gegen Tetanus und Diphtherie.

Noch einen Schritt weiter geht die rekombinante Synthese der Antigene mittels gentechnischer Methoden. Der erste in Deutschland zugelassene Impfstoff, der auf diese Art produziert wird, ist das exzellent verträgliche Hepatitis B Virus Vakzin, das „Surfaceantigen“ HBs enthält.

Erst seit relativ kurzer Zeit werden Impfmethode angedacht, die auch eine spezifische CD-8-T-Zellantwort hervorrufen. Entsprechende Impfstoffe gegen *Mycobacterium tuberculosis* (Baumann et al. 2006) oder Hepatitis-C-Viren (Matsueda et al. 2007) werden derzeit entwickelt.

Mit dem Ziel, noch besseren Schutz an den Eintrittspforten der Krankheitserreger zu erreichen und gleichzeitig die Compliance der Patienten zu erhöhen, gibt es inzwischen verschiedene alternative Applikationswege für die Vakzinierung.

4.2 Die parenterale Vakzinierung

Die parenterale Verabreichung des Impfstoffes ist der klassische Applikationsweg. Die Injektion erfolgt meist intramuskulär und führt zur Stimulation der durch Adjuvanzien oder andere Inhaltsstoffe angelockten Immunzellen. Die definierte Dosis ist gut standardisierbar und die Verabreichung relativ unproblematisch (geringe Rate von Fehlinjektionen in Gefäße oder Nerven). Immunzellen kehren nach ihrer Aktivierung meist in Gewebe von ähnlicher Beschaffenheit wie die des Aktivierungsortes zurück (Homing). Die meisten Infektionen beginnen aber an den Schleimhäuten, das Homing-Verhalten der aktivierten Immunzellen nach intramuskulärer Immunisierung ist also alles andere als ideal. Die Wirkung durch systemisch zirkulierende Antikörper vor Allem der Klasse IgG bleibt dabei aber natürlich erhalten und ist der Hauptwirkungsmechanismus dieses Impfvorgangs.

4.3 Die mukosale Vakzinierung

Die Schleimhäute (Mucosae) stellen eine riesige Oberfläche dar, die viel weniger geschützt ist als die Epidermis (Haut). Deshalb stellt sie die bevorzugte Eintrittspforte für Krankheitserreger dar die von Mensch zu Mensch übertragen werden.

Die bislang hauptsächlich angewendete intramuskuläre Injektion von Impfstoffen bewirkt jedoch nur eine geringe lokale Schutzreaktion an den Schleimhäuten. Applikation der Impfstoffe und Adjuvanzien auf Schleimhäute, wie etwa die Mund- oder Darmschleimhaut haben gezeigt, dass damit auch ein Schutz erreicht werden kann.

Am besten geeignet erscheint die nasale Gabe von Impfstoffen. So konnte bei Mäusen, Affen und auch beim Menschen nach nasaler Immunisierung nicht nur eine starke mukosale Antikörperreaktion im Respirationstrakt, sondern auch im Genitaltrakt sowie im Serum nachgewiesen werden. Dabei wurden ausnahmslos höhere Titer an systemischen Antikörpern induziert als bei den anderen mukosalen Immunisierungsrouten (Neutra & Koslowski 2006). Zusätzlich ist die nasale Applikation bei einem Patienten leicht anzuwenden und nicht invasiv.

Problematisch erscheint jedoch, dass die Menge des wirklich aufgenommenen Antigens nicht kontrolliert werden kann, kann es doch vom Schleim abgefangen oder noch vor der Aufnahme durch Proteasen gespalten werden. Deshalb muss eine große Menge an Antigen verabreicht oder durch häufige repetitive Gabe (Boostern) eine ausreichende Immunreaktion erzeugt werden. Außerdem sollte das Antigen ausreichend gut physikalisch mit dem Epithel wechselwirken können, um immunogen zu wirken.

4.4 Die Typ-III-vermittelte Vakzinierung

Manche gram negative Bakterien können über ein Proteininjektionssystem (Typ-III-Sekretionssystem oder T3SS) Effektorproteine in das Zytoplasma von Wirtszellen injizieren. Dieses System wurde in den letzten Jahren bereits ausgenutzt um nach Applikation spezieller bakterieller Impfstämme Antigene gezielt in das Zytoplasma von antigenpräsentierenden Zellen zu bringen und eine Immunreaktion auszulösen. Bislang untersucht wurden in dieser Hinsicht vor allem *Yersinia enterocolitica* und *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium (Rüssmann 2003). Hierbei wird ein attenuiertes Bakterium als Impfstoffträger benutzt und in der Regel einmalig oral appliziert. Das Bakterium kann aus dem Darm in andere lymphatische Organe des Körpers gelangen; es handelt sich also quasi um eine harmlose generalisierte Infektion. Da die eingesetzten Stämme jedoch ein Plasmid in sich tragen, das für den Impfstoff codiert, erzeugen sie diesen während des Zeitraums der Besiedelung. Die Impfstoffproteine werden nicht nur einfach zytoplasmatisch produziert, sondern unter Ausnutzung des Typ-III-Sekretionssystems, in das Zytoplasma von Wirtszellen, darunter auch Immunzellen wie Dendritische Zellen, injiziert.

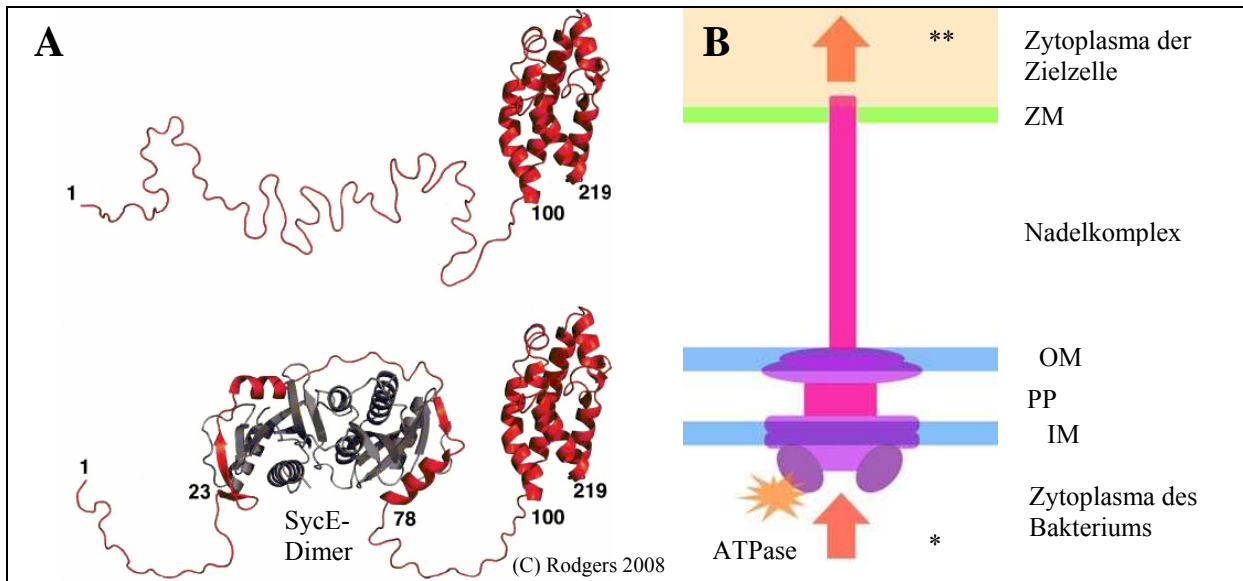


Abb. 3: Schema des Typ-III-Sekretionssystems (T3SS):

(A) Virulenzfaktoren werden im bakteriellen Zytoplasma (*) mit Hilfe von Chaperonen (z.B. SycE für das hier benutzte und dargestellte YopE) gebunden. Die dimeren Chaperone binden an die ersten etwa 100 Aminosäuren des Effektorproteins und bewirken einen Transport durch das Typ-III Sekretionssystem. (B) An der Basis des T3SS-Komplexes gebracht werden die Proteine unter Beteiligung einer ATPase entfaltet und via Nadelkomplex durch die Zytoplasmamembran (ZM) der Zielzelle hindurch injiziert (**). OM: Äußere Bakterienmembran (Outer Membrane); PP: Periplasma; IM: Innere Bakterienmembran

Das T3SS ist wie in **Abb. 3** zu erkennen eine Art molekulare Spritze, mit der Proteine in das Zytoplasma von Zellen injiziert (transloziert) werden können (Galan & Wolf-Watz 2006). Das Bakterium injiziert das Impfstoffprotein in das Zytoplasma der Zelle, was zu einer verstärkten Präsentation von Proteinfragmenten auf MHC-I-Rezeptoren und darüber hinaus zu einer spezifischen CD8-T-Zellantwort führt. Durch diesen Mechanismus liegt das Impfstoffprotein nur in sehr geringem Ausmaß extrazellulär vor. Daher erfolgt abhängig vom Antigen oft kaum eine Bildung von Antikörpern gegen den Impfstoff (Forrest et al. 1992; Lotter et al. 2004), was jedoch nur dann ungünstig ist, wenn diese auch für eine schützende Antwort benötigt werden.

Dieses elegante T-Zellen stimulierende Impfverfahren kommt mit einer einmaligen, nicht invasiven, oralen Applikation des Trägerorganismus aus, ist aber wegen des potenziellen Infektionsrisikos, für den Geimpften, nicht unproblematisch. Des Weiteren ist unklar, ob etwa Geimpfte mit einem bislang unbekanntem Immundefekt dann eine nicht mehr kontrollierbare Infektion durch den eigentlich harmlosen bakteriellen Impfstamm erleiden könnten.

4.5 Bekannte Impfversuche gegen ExPEC

Bisherige Impfstoffe gegen extraintestinal pathogene *E. coli* wie das Uro-Vaxom[®] (Schmidhammer et al. 2002) sind Totimpfstoffe, gewonnen aus verschiedenen pathogenen *E. coli*-Stämmen, die per oral eingenommen, das Immunsystem auf nicht näher bekannte Art und Weise stimulieren sollen und einen gewissen Schutz vermitteln können. Jedoch ist letztendlich nicht geklärt, warum und wie dieser Impfstoff überhaupt wirkt. Er ist nicht spezifisch gegen pathogene Mikroorganismen gerichtet und wies schon in den Studien bei einem nicht unerheblichen Teil der Probandinnen Nebenwirkungen auf, die zu einem Abbruch der Behandlung führten (Schmidhammer et al. 2002).

Spätere Ansätze zur Harnwegsinfektvakzinierung waren darauf ausgerichtet, eine möglichst starke Antwort spezifischer sekretorischer IgAs zu erreichen, um die in die Harnwege eindringenden Bakterien an der Adhäsion bzw. Kolonisierung zu hindern. Ein neuer Ansatz ist beispielsweise mit dem Impfstoff aus rekombinant hergestellten Typ-I-Fimbrien-Subfragmenten FimH und FimC gefunden worden. Damit gelang sowohl in der Maus als auch im Makaken ein gewisser Schutz gegen transurethrale Infektion (Langermann et al. 2000). Ein Schutz gegen rekurrente HWI konnte jedoch weder in klinischen Studien noch im Tiermodell gezeigt werden, außerdem ist auch FimH nicht spezifisch für pathogene *E. coli*-Stämme.

A 5. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte ein neuer Ansatz zur Impfung gegen ExPEC entwickelt werden, wobei die neuen Erkenntnisse zur Pathogenität von ExPEC und zur Pathogenese des Harnwegsinfektes berücksichtigt werden sollten. Dieses Konzept basiert auf spezifischen Virulenzfaktoren und virulenzassoziierten Proteinen als Zielstrukturen für eine spezifische Immunantwort. Im Besonderen sollten von möglichst vielen verschiedenen Virulenzfaktor-Proteinen die exponierten und hoch immunogenen Regionen ausgewählt und in optimierter Sequenz zusammen appliziert werden.

Damit nicht nur eine protektive Antikörperantwort, sondern auch eine spezifische T-Zellantwort induziert wird, sollten sowohl bioinformatisch prädizierte MHC-I- als auch MHC-II-Epitope in jedem Protein vereinigt vorliegen.

Der in dieser Arbeit entwickelte Impfstoff und das Impfverfahren sollten verstärkt auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort zielen. Zusammen mit den Beobachtungen, dass T-Zell-

defiziente Mäuse viel empfänglicher für HWI sind (Jones-Carson et al. 1999, Roberts 1999) und den Erkenntnissen, dass offensichtlich Antigene aus Phagosomen und Endosomen auf MHC-I kreuzpräsentiert werden können (Ramirez & Sigal 2004), sollte der zelluläre Aspekt der Immunantwort bei Infektionen mit ExPEC berücksichtigt werden.

Die Arbeit gliedert sich daher in vier Teilprojekte:

1. Impfstoffdesign:

- Auswahl virulenzspezifischer Oberflächenproteine von ExPEC mittels Microarray-Daten und computergestützte Strukturprädiktion zur Identifikation extrazellulärer, hydrophiler Anteile;
- nachfolgende Untersuchung dieser Regionen sowohl nach spezifischen MHC-I- und -II-Epitopen als auch nach Proteasomenschnittstellen unter Berücksichtigung der gewonnenen Daten;
- Erstellung der Aminosäuresequenz zweier Multi-Epitop-Proteine aus je acht immunogenen Abschnitten;
- In-vitro-Synthese von DNA mit optimierter Sequenz, die für die obigen Proteine codiert.

2. Impfstoffproduktion:

Expression der Multi-Epitop-Impfstoffproteine im *E. coli*-Expressionssystem, anschließende Aufreinigung mittels His-NTA-System und Gelfiltration für hohe Reinheit.

3. Antigenapplikation mittels Typ-III-Sekretionssystem von *Salmonella enterica*

Konstruktion von T3SS-Trägerstämmen, die erstmals ein komplett synthetisches Multi-Epitop-Protein als Vakzin translozieren sollen und Untersuchung der Funktionalität dieses Systems in *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium in vitro und in vivo.

4. Vergleich der Effektivität verschiedener Antigenapplikationswege:

Intranasal mit Adjuvans oder Typ-III-vermittelt (Lebendvakzine); Protektivitätstestung, Bestimmung der spezifischen T-Zellantwort und spezifischen Antikörperantwort.

B MATERIAL UND METHODEN

B 1. Material

1. 1 Geräte

| Gerät: | Modell: | Firma: |
|------------------------------|---------------------------------------|---|
| Analysenwaagen | Grobwaage: KERN 440-33N | Kern & Sohn GmbH, Albstadt* |
| | Feinwaage: Type 1801 | Sartorius, Göttingen |
| Brutschränke, Bakterien | Heraeus T12 und T20 | Heraeus, Hanau |
| Brutschränke, Zellen | Cytoperm2 und BBD 6220 | |
| Bunsenbrenner | FireBoy plus | Integra Biosciences, Wallisellen, CH |
| DNA/Protein-Software | Lasergene 5.08 | DNASTAR Inc., Madison, WI, USA |
| Durchflusszytometer FACS | Canto | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Durchflusszytometer-Software | FACSCanto | |
| Elektrophoresekammern | Flachbettkammern | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| | Protran II und Mini Protrans | BioRad, München |
| Elektroblot-Apparatur | Trans Blot Cell | |
| Elektroporations-Gerät | Gene Pulser II Pulse Controller II | |
| ELISA-Reader | Sunrise Remote | Tecan-Austria GmbH, Groeding |
| ELISA-Auswertungssoftware | Magellan V 3.11/ 3,1,1, | |
| Fermenter | BIOSTAT ® B | B.Braun Biotech international, Melsungen |
| Fermenter, Thermoelement | K20 | Thermo Haake, Karlsruhe |
| Gel-Dokumentationssystem | Molecular Imager ChemiDoc XRS | BioRad, München |
| Gel-Auswertungssoftware | Quantity One | |
| Heizplatte | IKA-RCT basic | IKA-Werke, Staufen |
| Heizblock | Unitek HB-130 | Miyachi Unitek Corp. Monrovia CA, USA |
| Tischinkubator | Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg |
| Mikroskope, Durchlicht | Axiovert 25 | Zeiss, Oberkochen |
| Mikroskop, Fluoreszenz | Leica DM IRB | Leica, Bensheim |
| Mikroskop-Fotosoftware | Meta-Morph 6.0 | Universal Imaging, Downington, PA, USA |
| Magnet-Aufreinigung | Octa-Macs | Miltenyi, Bergisch-Gladbach |
| Magnet-Rührer | IKAMAG REO | IKA-Werke, Staufen |
| Neubauer Zählkammer | | Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen |
| Organ-Mörser | MM2000 | Kurt Retsch GmbH, Haan |
| Thermocycler | GeneAmp PCR System 9700 | Applied Biosystems, Foster City CA, USA |
| | Mastercycler gradient | Eppendorf, Hamburg |
| pH-Meter | pH3000 | Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten (WTW), Weilheim |
| Röntgenfilmentwicklungsgerät | FPM-100A | Fuji Photo Film, Tokio, Japan |
| Schüttelinkubatoren | Certomat BS-1, H- und -R | B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen |

| | | |
|---------------------|--------------------------|--|
| | CMV-Rom | Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau |
| Spannungsquellen | Powerpack 200 und 300 | BioRad, München |
| Spektralphotometer | Ultrospec 3100 | Amersham Biosciences Ltd., Cambridge, UK |
| Sterilwerkbänke | UVF 6.18 S | BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen |
| | UVT 6.12 S | |
| UV-Transilluminator | TFX-20.M | Vilber Lourmat, La Vellée, F |
| Vakuumentrifuge | Savant DNA110 Speed Vac | Global Medical Instrumentation Inc., Ramsey, MN., USA |
| Video Printer | UP-895 CE | Sony Corp., Tokio, Japan |
| Zentrifugen | Super T21 Rotor: ST-H750 | (früher Sorvall) Thermo Electron Corporation, Waltham MA, USA |
| | 5417C Rotor: F 45-30-11 | Eppendorf, Hamburg |
| | 5417R Rotor: FA 45-30-11 | |
| | 5810R Rotor: FA 45-30-11 | |
| | 3K18 Rotor: 19776-H | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA |

* Wenn hier und im Folgenden kein Land genannt wird, liegt der Ort in Deutschland.

1. 2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

| | |
|---------------------------------|---|
| AA/BA (Acrylamid, Bisacrylamid) | National Diagnostics, Argonne, IL., USA |
| APS (Ammoniumpersulfat) | Bio-Rad, München |
| DEPC (Diethylpyrocarbonat) | Sigma, Deisenhofen |
| dNTP (dTTP, dGTP, dCTP, dATP) | Boehringer, Mannheim |
| MgCl ₂ 25 mM | Boehringer, Mannheim |
| PI (Propidiumiodid) | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Trypanblau | Fluca Chemie, Buchs |

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden die übrigen Chemikalien und Feinchemikalien von den Firmen Biomol (Hamburg), E. Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Der Reinheitsgrad sämtlicher Chemikalien war p.a. (zur Analyse).

Kunststoff- und andere Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: B. Braun (Melsungen), Eppendorf (Hamburg), Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Nürtingen), Nunc (Roskilde, Dänemark), Sartorius (Göttingen), Schleicher & Schuell (Dassel).

1. 3 Puffer und Lösungen

1. 3. 1 Puffer und Lösungen für die Agarose-Gel-Elektrophorese

| | | |
|---------------------------------|--|--|
| Agarose: | | Cambrex Biosciences, Pockland ME, USA |
| 10x TAE-Puffer: | 0,4 M Tris-HCl | Gibco BRL, Karlsruhe |
| | 50 mM Natriumacetat | E. Merck, Darmstadt |
| | 10 mM EDTA, pH 7,6 einstellen | |
| 10x Probenpuffer (DNA-Stopmix): | 0,25 % (w/v) Bromphenolblau | Sigma, Deisenhofen |
| | 25 % (v/v) Ficoll400 | Biomol, Hamburg |
| Ethidiumbromid-Lösung: | Stock: 25 mM (10 mg/ml) in A _{bidest} | Sigma, Deisenhofen |

1. 3. 2 Gele, Puffer und Lösungen für SDS-PAGE

| | | | | |
|--------------------------------------|---------------|---------|----------------|---------|
| Acrylamidgehalt | Sammelgel: 4% | | Trenngel: 10 % | |
| A _{bidest} | 4400 µl | | 6200 µl | |
| Protogel | 1260 µl | | 5000 µl | |
| Tris-HCl | pH 6,8 | 1880 µl | pH 8,8 | 3800 µl |
| APS (Ammoniumpersulfat) | 50 µl | | 100 µl | |
| TEMED (N,N,N'N'-Tetramethylendiamin) | 10 µl | | 10 µl | |

| | |
|------------------------------|--|
| 2 x Laemmli-Protein-Stopmix: | 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 |
| | 4 % SDS (Na-Dodecylsulfat) |
| | 20 % Glycerin |
| | 2 % β-Mercaptoethanol |
| | 0,01 % Bromphenolblau |
| 10 x Laemmli-Laufpuffer: | 30,2 g Tris-HCl |
| | 142,6 g Glycin, ad 1000 ml A _{bidest} |
| Coomassie-Blau-Färbung: | 0,125 % Coomassie-Blau (Serva, Heidelberg) |
| | 50 % Methanol |
| | 10 % Eisessig, in A _{bidest} |
| Entfärbelösung: | 5 % Methanol |
| | 7 % Eisessig in A _{bidest} |

1. 3. 3 Puffer und Lösungen für Immunoblots/Western-Blots

| | |
|---------------------------|---|
| Waschpuffer: 1x TBS-T | |
| 1000 ml 10x TBS-T: | 0,5 M (60 g) Tris |
| | 1,37 M (80 g) NaCl |
| | 27 mM (2 g) KCl |
| | 10 ml Tween20, pH 8,0 einstellen |
| Blockierungspuffer: | 5% Magermilchpulver (w/v) in 1x TBS-T |
| Detektioreagenz für HRPO: | Immobilon Western Substrate (Millipore, Schwalbach, Hq. Billerica, MA, USA) |

1. 3. 4 Puffer für die Proteinaufreinigung

| | |
|-----------------------------------|--|
| Lysepuffer (Puffer B) | 100 mM NaH ₂ PO ₄ |
| | 10 mM Tris·Cl |
| | 8 M Urea, vor Einsatz pH 8,0 mit NaOH einstellen |
| Waschpuffer (Puffer C) | 100 mM NaH ₂ PO ₄ |
| | 10 mM Tris·Cl |
| | 8 M Urea, vor Einsatz pH 6,3 mit HCl einstellen |
| Elutionspuffer (Puffer E) | 100 mM NaH ₂ PO ₄ |
| | 10 mM Tris·Cl |
| | 8 M Urea, vor Einsatz pH 4,5 mit HCl einstellen |
| TCA für Fällungen von Überständen | 100g TCA (kristallin) auf 70ml A _{bidest} |

1. 3. 5 Puffer und Lösungen für die Enzym-Immunoassays

| | |
|---|--|
| ELISA: | |
| Beschichtungspuffer für Maxi-Sorb-Platten (Nunc, Roskilde, DK): | 100 mM NaHCO ₃ |
| | 4,5 M Urea in A _{bidest} pH 9,8, Einstellung mit NaOH |

| | |
|--|---|
| Waschpuffer: | TBS-T |
| Blockierungspuffer: | 1% BSA (w/v) in PBS |
| Entwicklungslösung: | 1 Tablette Sigma104 pro 5 ml Entwicklungspuffer, bestehend aus 9,7 ml/l Diethanolamin, 20 mM MgCl ₂ , pH 9,8 |
| ELISpot: | |
| Beschichtung für Silent-Screen-Platten (Nunc, Roskilde, DK): Puffer A: | 35 mM (= 2,93 g) NaHCO ₃ in 100 ml A _{dest} |
| Puffer B: | 15 mM (= 1,59 g) Na ₂ CO ₃ in 100 ml A _{dest} |
| Waschpuffer: | 500 ml PBS und 1.25 ml Tween20 |
| HPO ₄ -Streptavidin-Konjugat: | 5,5 ml Waschpuffer |
| | 275 µl FKS |
| | 22 µl HPO-Streptavidin |
| AEC-DMF-Lösung: | 1 Tablette AEC (Sigma) |
| | 2,5 ml DMF |
| | 47,5 ml 50 mM Na-Acetat |
| | 25 µl 30% H ₂ O ₂ |

1. 3. 6 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie (FACS)

| | |
|---|--------------------------------------|
| Medium RPMI (pur) in kalt und warm | |
| Waschpuffer: | 0,5 % (w/v) BSA und 2 mM EDTA in PBS |
| PI (Dead-staining, ohne Fixierung möglich): | 0,5 µg/ml Endkonzentration. |

1. 3. 7 Puffer und Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie

| | |
|------------------------------|---|
| Fixierung: | 3,7 % Formaldehyd (v/v) in PBS |
| Hintergrundsunterdrückung : | 50 mM NH ₄ Cl in PBS |
| Permeabilisierungspuffer: | 0,1 % Triton X-100 in PBS |
| Waschpuffer: | 3 % BSA (w/v) in PBS |
| Kernfärbung: | 0,2 µg/ml DAPI in PBS |
| Einbettung und Versiegelung: | 2,4 g Mowiol 4-88 (Hoechst AG, Frankfurt) |
| | 6 g Glycerol, 6 ml A _{bidest} |
| | 12 ml 0,2 M Tris, pH 8,5 einstellen |
| | 2,5 % DABCO (v/v) |
| | transparenter Nagellack |

1. 4 Kits

| Verwendung: | Kit: | Firma/Niederlassung: |
|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Isolierung chromosomaler DNA | Puregene DNA Purification | Gentra (Minneapolis, MN, USA) |
| Aufreinigung von PCR-Produkten | PCR Purification | Qiagen (Hilden) |
| DNA-Aufreinigung aus Agarose-Gel | Gel-Spin | |
| Plasmid-DNA-Isolierung | Nucleobond AX20 u. AX100 | Macherey-Nagel (Düren) |
| | QIAprep Spin Miniprep | Qiagen (Hilden) |
| Proteinaufreinigung | Ni-NTA Spin Kit and Columns | |

1.5 Elektrophoresemarker

| | | |
|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| DNA-Längenstandard: | 100bp- bzw. 1000bp-Leiter | Fermentas Life Sciences, St.Leon-Rot |
| Protein-Größenstandard: | PageRuler Protein Ladder | |
| | PageRuler Prestained Protein Ladder | |

1.6 Antikörper

| | | |
|----------------------------------|--|-------------------------------------|
| für die Immunfluoreszenzfärbung: | Monoklonaler AK gegen m45 | eigene Zucht |
| | monovalenter AntiO4-AK aus dem Kaninchen | Sifin, Berlin |
| für ELISA: | Monoklonaler AK gegen m45 als Positivkontrolle | eigene Zucht |
| | Anti-Maus-IgA aus der Ziege, AP-Konjugat | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA |
| | Anti-Maus-IgG-IgM aus der Ziege, AP-Konjugat | Dianova, Hamburg |
| für Elispot: | Anti-Mouse IFN- γ | Biosource, Camarillo, CA, USA |
| | Biotinylated Rat Anti- Mouse IGF- γ | |
| | Monoclonal Antibody | BD Biosciences, San Jose, CA, USA |
| | Avindin-Horseradish Peroxidase (Av- HRPO) Conjugate | |
| für Catch Assay: | monoklonale AntiCD4 FITC | Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach |
| | monoklonale AntiCD8 FITC | |
| | monoklonale AntiIFN- γ -PE | |
| | monoklonaler AntiPE Micro Beads, gekoppelt an monoklonale Maus-Anti-PE IgG | |
| | divalenter AntiCD45 / Anti IFN- γ -AK | |
| | Propidium Iodid (PI) | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |

1.7 Enzyme, Proteine und Inhibitoren

Für DNA-Arbeiten:

| DNA-Polymerasen: | Puffer: | Firma: |
|------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| Taq | Qbiogene Standard Buffer | Qbiogene Europe, Illkirch, Frankreich |
| Pfu | Pfu Puffer 10x | Stratagene, La Jolla, CA, USA |
| Ampli-Taq | Standard Puffer | Perkin-Elmer, Überlingen |
| Ampli-Taq Gold | Gold-Standard Buffer | Roche, Basel |
| LA-PCR | LA-PCR Buffer-Mg ²⁺ | TaKaRa, Otsu, Shiga, Japan |
| Ampli-Taq | GeneAmp 10x-Puffer | Perkin-Elmer Waltham, MA, USA |
| DNA-Ligase: | Puffer: | Firma: |
| T4-DNA-Ligase | Standard Puffer | Fermentas Life Sciences, St.Leon-Rot |

Sonstige:

| | | |
|--|--------------------------------------|----------------------------------|
| Lysozym für den Zellaufschluss | | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA |
| BSA (Rinder-Serum-Albumin) zum Blocken | | Biomol, Karlsruhe |
| Cell-Culture Grade Fraction V BSA | | Serva, Heidelberg |
| Protease-Inhibitor | PMSF (Inhibitor von Serin-Proteasen) | Roche, Basel |

1. 8 Synthetische Peptide

Synthetische Peptide wurden bestellt bei GenScript Corporation, Scotch Plains, NJ, USA.

| Bez. | Masse [Da] | Menge [mg] | Sequenz: |
|---------|------------|------------|---|
| IreA #1 | 3254.7 | 9 | GIAKAFRAPSIREVSPGFGLTQGGASIMYGN |
| IreA #2 | 4169.6 | 9 | RRKSDDESLNGKSLKGEPLERTPRHAANAKLEWDYT |
| IreA #3 | 2981.3 | 9 | LRDDSATGKKTETQSVSIKQKAVFIE |
| IutA #1 | 3757.0 | 7 | NRVDDFIDYTQQQKIAAGKAISADAIPGGSVDYDN |
| IutA #2 | 5697.4 | 5 | FSQGVALPDPGKYYGRGIYGAAVNGHLPLTKSVNVS DSKLEGVKVDSYELGWR |

1. 9 Synthetische Oligonukleotide/ Primer

Die für die PCR verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion, Martinsried, synthetisiert. Alle Primer wurden in 100 pmol/µl bestellt und für den Verbrauch auf 20 pmol/µl aliquotiert.

| Name der Primer | 5'-...3'-Sequenz | °C | Fragmentlänge, bp |
|-------------------------|--|----|-----------------------------|
| ChuA-16.for | 5'-GTTTCTGCCACCTTGCCAACG-3' | 54 | 470 |
| ChuA-2.rev | 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3' | | |
| FyuA-1080.for | 5'-CTACGACATGCCGACAATGCC-3' | 58 | 629 |
| FyuA-1709.rev | 5'-TGCTCCCGCGCCATAACGTG-3' | | |
| Iha-irgA-262.for | 5'-CTGTACAGCGCTCAGTGACGA-3' | 60 | 508 |
| Iha-irgA-770.rev | 5'-AGGCGGTGTGACCACGGGATA-3' | | |
| IreA-102.for | 5'-TGTTACTGCCTCCGGGTTTAC-3' | 56 | 397 |
| IreA-499.rev | 5'-CCCAAGTCCAAGTACGCCATC-3' | | |
| IroN-28.for | 5'-CTAACTGTGCTCCTGGTTGGGTTGA-3' | 58 | 2025 |
| IroN-2053.rev | 5'-TGACGCCGACATTAAGACGCAGATT-3' | | |
| IutA-324.for | 5'-CAGCAGCCAGAGCCGAACCAA-3' | 58 | 371 |
| IutA-695.rev | 5'-CATCGCCGTTACCGTCAAACC-3' | | |
| Usp-285.for | 5'-GGGTGAAGGTACGCCGTATGA-3' | 56 | 534 |
| Usp-819.rev | 5'-ATAAACTGCGCCAATAAACT-3' | | |
| pQE-promotor region.for | 5'-CCCGAAAAGTGCCACCTG-3' | 53 | seq |
| pQE-seq.rev | 5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG-3' | 41 | seq |
| Seq-pASK-IBA.for | 5'-GAGTTATTTTACCACTCCCT-3' | 42 | seq |
| Seq-pASK-IBA.rev | 5'-CGCAGTAGCGGTAAACG-3' | 47 | seq |
| Vol1.for | 5'-GATCCAACCGCGTGGACGACT-3' | 63 | 1012 |
| Vol1.rev | 5'-TGCAGCTGGAGCAGGATGCGG-3' | | |
| Vol1.start.rev | -GTCCGCCGAGATAGCTTTGCCCG-3' | 72 | seq |
| Vol2.for | 5'-GATCCCTGCGTGACGATAGCG-3' | 63 | 1009 |
| Vol2.rev (II) | 5'-TGCAGCTGCAACAGGATGCGC-3' | | |
| Vol2.start.rev | 5'-ACCGCTTCTGTTGATAGATAC-3' | 59 | seq |
| For.DHFR-m45-PstI | 5'-ATGCTTggatccTCAGAAGAACTCGTCAAGAA-3' | 43 | Vektor-Ringschluss pQE-pEpM |
| Rev.DHFR-m45-PstI | 5'-AATGCCgcatccGATAATgtcgacCTTCGCCACC CCAGCTTCAA-3' | | |

| | | | |
|----------------|--|----|------|
| F1-usp.Sst.for | 5'-ATCAGagctcCTACTGTTCCCGAGTAGTGTGTTG-3' | 61 | 1035 |
| R-usp.Pst.rev | 5'-AAActgcagTCTCCTGTAGTGAATTTTCATCATG-3' | | |
| F1-iha.Bam.for | 5'-ATCAGgatccCGAATAACCACTCTGGCTTCCGTA-3' | 62 | 2087 |
| R-iha.Sal.rev | 5'-AAAgtcgacGAACTGATAGTTCAGCGACATCCA-3' | | |

1.10 Zellbiologisch wirksame Substanzen

| | |
|--|--|
| IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid-) Stocklösung in A _{bidest} | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA |
| AHT (Anhydrotetrazyklin) | IBA GmbH, Göttingen |
| ConA (ConcanavalinA) | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA |
| Choleratoxin, Azide-free | Quadragech, Epsom, UK |
| MF59C, 10ml bestehen aus: 0,195 g Squalene 0,3350 g Sorbitantriöleat 0,2350 g Polysorbat 80 1320 g Na-Citrat 0,0080 g Citronensäure (H ₂ O-frei) | Marienapotheke, Sendlingertorpl., München |

1.11 Zell-Linien

| | | |
|---------|---|--|
| HCV29 | humane Urothelzelllinie, immortalisiert | Masters et al. 1986; Bean et al. 1974 |
| Bl6-F10 | Mausmelanomzelllinie | ATCC CRL-6475 |
| m45 | Maushybridomazelllinie | P. Hearing, SUNY, Stony Brook, NY, USA |

1.12 Bakterienstämme

| Stämme/Plasmide | Eigenschaften/ Verwendungszweck | Herkunft |
|----------------------------------|--|--------------------------------|
| <i>E. coli</i> | | |
| TOP10 | für Klonierungen | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |
| BL21 | zur Expression | Promega, Madison, WI, USA |
| SCS110 | pQE30-Vektor für Klonierungen | Stratagene, La Jolla, CA, USA |
| M15 prep4 | für pQE-Vektor Expressionen | Qiagen (Hilden) |
| SCS110 pQE-Vol1 | für Klonierungszwecke | diese Arbeit |
| SCS110 pQE-Vol2 | für Klonierungszwecke | diese Arbeit |
| M15 prep pQE-Vol1 | zur Expression, Impfprotein Vol1 | diese Arbeit |
| M15 prep pQE-Vol2 | zur Expression, Impfprotein Vol2 | diese Arbeit |
| TOP10 pASK-IBA37+Vol1 | zur Expression, Impfprotein Vol1 | diese Arbeit |
| TOP10 pASK-IBA37+Vol2 | zur Expression, Impfprotein Vol2 | diese Arbeit |
| SCS110 pQE30 iha | zur Expression, Iha | diese Arbeit |
| M15 Prep4 pQE30 usp | zur Expression, usp | diese Arbeit |
| BL21 pLysS pASK.IBA33+ FyuA | zur Expression, FyuA | Kirsten Messmer, unveröffentl. |
| pASK-IBA37+ IroN | zur Expression, IroN | Kirsten Messmer, unveröffentl. |
| Top10 pBAD HisA ChuA | zur Expression, ChuA | Sebastian Loos, unveröffentl. |
| SCS110 pControl 6xHis-DHFR-m45 | für Klonierungszwecke | diese Arbeit |
| M15 prep pControl 6xHis-DHFR-m45 | zur Expression Kontrollprotein | diese Arbeit |
| CFT073 | i.p. Challenge und intravesikale Challenge | Mobley et al. 1990 |

| <i>Salmonella enterica</i> S. Typhimurium | | |
|---|--|----------------------|
| SB824 | Impfstamm, Spt P und Aro A Doppelmutante | Rüssmann et al. 1998 |
| SB300 (WT) | Infektionskontrolle | Kangia et al. 1994 |
| TOP10F pST1 | für Klonierungszwecke | diese Arbeit |
| TOP10F pSS1 | für Klonierungszwecke | diese Arbeit |
| TOP10F pST2 | für Klonierungszwecke | diese Arbeit |
| TOP10F pSS2 | für Klonierungszwecke | diese Arbeit |
| SB824 pST1 | Typ-III Impfstamm Vol1 | diese Arbeit |
| SB824 pSS1 | Typ-III Kontrollstamm Vol1 | diese Arbeit |
| SB824 pST2 | Typ-III Impfstamm Vol2 | diese Arbeit |
| SB824 pSS2 | Typ-III Kontrollstamm Vol2 | diese Arbeit |

1.13 Nährmedien und Zusatzlösungen

1.13.1 Nährmedien und Zusatzlösungen für die Zellkultur

| | | |
|---|--|--------------------------------|
| Zellkulturmedium für HCV29- und Bl6-F10-Zellen: | supplementiertes RPMI-1640 VLE-RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaOH, ohne L-Glutamat | PAN Biotech, Aidenbach |
| | 10% FKS (v/v) 30 min bei 60°C hitzeinaktiviert | |
| Antibiotika bei Bedarf: | 100 U/ml Penicillin | Biochrom, Berlin |
| | 100 µg/ml Streptomycin | |
| Zusatzlösungen für die Zellkultur: | DPBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺) autoklaviert | Gibco BRL, Karlsruhe |
| | PBS, autoklaviert | im Haus hergestellt |
| | Trypsin/EDTA-Lösung: 0,05 % Trypsin (v/v) 0,02 % EDTA in PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ | PAN Biotech, Aidenbach |
| | Trypanblau 0,5% | Fluca Chemie, Buchs |
| | PI | BD, Franklin Lakes, NJ, USA |

1.13.2 Nährmedien und Zusatzlösungen für die Bakterienkultur

| | |
|----------------------------|---|
| Luria-Bertani (LB)-Medium: | 5 g (85 mM) NaCl |
| | 5 g Bacto Hefeextrakt (Difco, Kansas City, MO, USA) |
| | 10 g Bacto Trypton (Difco) |
| | in 1000 ml A _{bidest} , pH 7,4-7,6 mit NaOH einstellen |

Spezielle Zusätze:

Die Anzucht von *E. coli* für Klonierung und Herstellung von rekombinantem Protein erfolgte in LB Medium (flüssig oder fest als Agar) mit 2% Glucose.

Die Anzucht von *Salmonella* Typhimurium zur Infektion und Vakzinierung wurde in hyperosmolarem LB Medium durchgeführt (statt 85 mM wurden 300 mM NaCl eingesetzt).

| | |
|-------------------------------------|--|
| Einfrüermedium für Bakterien: | 25 % Glycerin (v/v, E. Merck) in LB-Medium |
| LB-Agarplatten | 15 g Bacto Agar (Difco) in 1000 ml LB-Medium |
| MH-Platten und Blutplatten | (PAN-Biotech) |
| SOC-Medium: | 2 % Trypton (10 g) |
| | 0,5 % Hefeextrakt (2,5 g) |
| | 10 mM NaCl (0,29 g) |
| | 2,5 mM KCl (1,25 ml von 1 M Stock) |
| | jetzt pH 7,5 einstellen und autoklavieren |
| | 10 mM MgCl ₂ (5 ml 1 M Stock) |
| | 10 mM MgSO ₄ (5 ml 1 M Stock) |
| | 20 mM Glucose (0,5 ml von 2 M Stock -20°C) |
| | auf 500 ml mit A _{bidest} auffüllen, pH 7,5 |
| Aufbewahrung in Aliquots bei -20 °C | |

1.13.3 Antibiotika

Antibiotika wurden den Nährmedien zugesetzt, wenn die Bakterien die entsprechende Resistenz aufwiesen, und zwar dem Agar erst nach dem Autoklavieren (bei < 50°C), den Flüssigmedien erst kurz vor deren Verwendung.

| Antibiotikum | Abkürzung | Lösungsmittel | Stammlösung [mg/ml] | Endkonzentration [µg/ml] |
|--|-----------|-------------------|------------------------------------|---------------------------|
| Ampicillin (Boehringer, Mannheim) | Amp | A _{dest} | 100 | 100 |
| Kanamycin (Oxoid, Wesel) | Km | A _{dest} | 50 | 50 |
| Streptomycin (Biochrom, Berlin) | Strep | A _{dest} | 100 | 100 |
| Ciprofloxacinhydrochlorid (ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA) | Cip | A _{dest} | immer frisch angesetzt: 8 mg/ml | 20 mg/kg Gewicht der Maus |
| Gentamicin (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) | Gm | A _{dest} | 10 | 100 |
| Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) | Cm | Methanol | 50 | 30 |

B 2 Methoden

2. 1 DNA-Methoden

2. 1. 1 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die PCR (Mullis et al. 1986, Saiki et al. 1988) ermöglicht die spezifische Vervielfältigung (Amplifikation) eines DNA-Abschnitts mittels thermisch stabiler DNA-Polymerase, d-NTPs (Desoxynukleotidtriphosphaten) und Primern, einzelsträngigen Nukleotidsequenzen, welche von einer DNA-Polymerase erkannt werden und Startpunkt der DNA-Synthese sind (**Tab. 1**). Zunächst wird die DNA durch Denaturieren bei 95°C in zwei Einzelstränge zerlegt. Zur spezifischen Anlagerung der beiden Primer an komplementäre DNA-Abschnitte (Annealing) wird die Temperatur auf die primersequenzspezifische Schmelztemperatur (s. **Tab. 2**) abgesenkt. Zur folgenden Elongation erhöht man die Temperatur auf das Reaktionsoptimum der Polymerase, wodurch die dNTPs entlang der DNA-Matrize zu einer komplementären Sequenz verknüpft werden. Durch erneute Denaturierung werden die neu synthetisierten DNA-Stränge von der Ausgangs-DNA gelöst und dienen nun ihrerseits als Matrize für die nächste Elongationsphase. Eine 30- bis 35-malige Wiederholung dieses Zyklus ermöglicht die exponentielle Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz. Eine letzte Elongationsphase ermöglicht das Auffüllen noch unvollständiger DNA-Abschnitte (s. **Tab. 2**).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte je nach Bedarf entweder als Screening-PCR aus Bakterienkolonien bzw. gekochten Zellen oder als PCR isolierter chromosomaler bzw. Plasmid-DNA. Für die Screening-PCR wurde eine geringe Menge der Bakterienkolonie auf einer Pipettenspitze direkt in die PCR-Röhrchen verbracht. Zur PCR gekochter Zellen wurde eine kleine Menge Flüssigkultur oder Bakterienmasse in 100 µl A_{bidest} gelöst und auf dem Heizblock 10 min bei 95°C bzw. in der Mikrowelle 30 sec gekocht. Isolierte chromosomale oder Plasmid-DNA wurde in Verdünnungen zwischen 1:200 und 1:5000 als Template eingesetzt.

Die Größe des Reaktionsansatzes variierte zwischen 25 µl (Screening) und 100 µl (Klonierung). Für PCR Amplifikationen für Klonierungen wurden die Pfu- und Taq-Polymerasen benutzt.

| Reaktionsansatz: | 100 µl | 25 µl | Colony-PCR 25 µl |
|---|-----------------|------------------|------------------|
| Primer 1 (20 µM) | 2 µl | 0,5 µl | 0,5 µl |
| Primer 2 (20 µM) | 2 µl | 0,5 µl | 0,5 µl |
| Template (DNA) | 50-500 ng 10 µl | 50-500 ng 2,5 µl | Kolonie |
| 10xTaq-Reaktionspuffer | 10 µl | 2,5 µl | 2,5 µl |
| dATP, dCTP, dGTP, dTTP (jedes 10 mM) | 4 µl | 1 µl | 1 µl |
| A _{bidest} | ad 100 µl | ad 25 µl | ad 25 µl |
| Taq-Polymerase 5 U/µl | 0,8 µl | 0,2 µl | 0,2 µl |

Tab. 1: PCR

| | Denaturierung | 95°C | 5 min (oder 10 bei Kolonie PCR) |
|--------------|---------------|------|---------------------------------|
| 30-35 Zyklen | Denaturierung | 95°C | 30 sec |
| | Annealing | ** | 45 sec |
| | Elongation | 72°C | *min |
| 1x | Elongation | 72°C | 7 min |
| 1x | Abkühlung | 4°C | bis zum Abbruch |

* 1 min pro 1 kb zu amplifizierende DNA; ** Temperatur von der Primersequenz und -länge abhängig

Tab. 2: Klassisches Reaktionsprogramm:

Zur Kontrolle wurde ein Teil (10 µl) der PCR-Produkte per Gel-Elektrophorese aufgetrennt und analysiert. Für weitere Klonierungen wurden die PCR-Produkte entweder unmittelbar durch das PCR-Aufreinigungs-Set (PCR Purification Kit) oder aus dem Agarose-Gel mittels Gel-Aufreinigungs-Set (Gel-Spin, s. B 1.4) aufgereinigt und sofort benutzt bzw. bei 4°C aufbewahrt.

2. 1. 2 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden zwei verschiedene Kits mit etwas unterschiedlichen Verfahren verwendet. Wurden für Klonierungen größere Plasmidmengen (bis zu 100 µg) benötigt, kam das Nucleobond AX20-Kit zum Einsatz, für das Klon-„Screening“ oder Klonieren mit Multikopievektoren das QIAprep Spin Miniprep Kit (s. B 1.4).

Beide Kits basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly 1979). Dabei wird Plasmid-DNA von chromosomaler DNA und von Bakterienproteinen abgetrennt, indem die Bakterien in kurzen Zeitabständen drei verschiedenen Puffern ausgesetzt werden. Zuerst werden die Bakterien unter hypertonen und Ca²⁺/Mg²⁺-komplexbildenden Bedingungen in Glucose-EDTA-haltigem Puffer resuspendiert, was zur Destabilisierung der Zellmembranen führt. Freiwerdende Bakterien-RNA wird durch die im Puffer enthaltene RNase verdaut. Bei der nun folgenden alkalischen Lyse in einem SDS-NaOH-Puffer (pH 12,5) werden die

Proteine und lineare DNA (chromosomale Fragmente) denaturiert und RNA durch alkalische Spaltung der Ribose degradiert. Plasmid DNA bleibt als zirkuläre doppelsträngige DNA stabil erhalten. Der dritte, essigsäurehaltige Puffer renaturiert die freien Nukleinsäuren der Plasmid-DNA, wohingegen die chromosomale DNA weiterhin an die durch SDS denaturierten Proteine gebunden bleibt. Mittels der in der Lösung ebenfalls vorliegenden Kaliumionen werden die SDS-Komplexe ausgefällt und können abzentrifugiert werden. Den plasmid-DNA-haltigen Überstand überführt man zur Reinigung auf eine Anionenaustauscher-Säule. Aus dieser wurde in der vorliegenden Arbeit die Plasmid-DNA beim QIAprep Spin Miniprep Kit mit A_{bidest} , beim Nucleobond AX20-Kit jedoch mit Elutionspuffer eluiert und anschließend mit Isopropanol und 70 %igem Ethanol ausgesalzt. Die gewünschte DNA-Konzentration wurde durch Verdünnen mit A_{bidest} bzw. Eindampfen in der Vakuumentrifuge (Speed Vac) eingestellt.

2. 1. 3 Gewinnung chromosomaler DNA

Zur Gewinnung chromosomaler DNA wurde der Puregene® DNA Purification Kit (s. B 1.4) nach Angaben des Herstellers eingesetzt: Zur Lyse der Zellen füllt man 5 ml einer ü.N.-Kultur mit $5 \cdot 10^9$ Zellen in ein 50 ml-Röhrchen, zentrifugiert (3 min, 1000·g) und pipettiert den Überstand ab. Das Zellpellet wird in 3 ml Zelllyse-Puffer resuspendiert und 5 min bei 80°C inkubiert. Zum Zelllysate gibt man 15 ml RNase A-Lösung, mischt die Probe durch 25-maliges Umschwenken und lässt das Enzym 15-60 min bei 37°C einwirken. Zur Proteinausfällung kühlt man die Probe auf RT ab, fügt 1 ml Protein-Präzipitations-Lösung hinzu und vortext alles gründlich für etwa 20 sec. Anschließend zentrifugiert man (4°C, 10 min, 2000·g) und erhält ein dichtes Proteinpellet.

Den DNA-haltigen Überstand überführt man in ein 15 ml-Röhrchen, das 3 ml 100 % Isopropanol enthält, mischt die Probe durch 50-maliges Umdrehen und zentrifugiert ab (3 min, 2000·g). Die DNA ist nun als kleines weißes Pellet erkennbar. Man gießt den Überstand ab, trocknet das Röhrchen und wäscht das Pellet in 3 ml 70 %igem Ethanol. Man zentrifugiert 1 min mit 2000·g, zieht das Ethanol vorsichtig mit einer Pipette ab und lässt das Pellet 15 min an der Luft trocknen. Danach löst man die DNA mit 500 µl DNA-Hydrations-Lösung 1 h bei 65°C oder ü.N. bei RT. Für kürzere Zeit kann man die Probe bei 4°C, für längere bei -20°C oder -80°C lagern.

2. 1. 4 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind DNAsen (erste Isolierung durch Linn and Arber 1968, Meselson and Yuan 1968, Smith and Wilcox 1970 sowie Kelly and Wilcox 1970), die bestimmte DNA-Sequenzen erkennen und diese spezifisch in Teilstücke mit charakteristischen Enden schneiden können (Danna and Nathans 1971, Roberts 2005). Ihre Bezeichnung richtet sich nach ihrer Herkunft: Der erste Buchstabe steht für die Bakterien-Gattung, die nächsten beiden stehen für die Spezies, z.B. *EcoRI* für *Escherichia coli*.

| Enzym | Schnittsequenz: | Eigenschaften: |
|---------------|-----------------|---|
| <i>Bam</i> HI | G’GATCC | durch Dam, Dcm, CpG – Methylasen blockiert |
| <i>Kpn</i> I | GGTAC’C | nicht durch klassische K-12 <i>E. coli</i> Methylasen beeinflusst |
| <i>Sal</i> I | G’TCGAC | durch CpG – Methylasen blockiert |
| <i>Pst</i> I | CTGCA’G | nicht durch klassische K-12 <i>E. coli</i> Methylasen beeinflusst |

Tab. 3: Restriktionsenzyme zur Klonierung

Die in dieser Arbeit eingesetzten Restriktionsenzyme schneiden in einer 6 bp langen Palindromsequenz und erzeugen sog. „sticky ends“, einsträngige, überstehende Enden, die bei einer folgenden Ligation (B 2.1.5) leicht mit komplementären DNA-Fragmenten verbunden werden können. Die Schnitte wurden anhand von Karten des gewünschten Genmaterials geplant. Zum DNA-Verdau wurden Reaktionsansätze angemessener Größe verwendet, für Klonierungen in der Regel 60 µl, für Kontrollen 10 µl (**Tab. 4**).

| Reaktionsansätze: | 10 µl-Ansatz (Kontrolle bei allen Schnittansätzen) | 60 µl-Ansatz (Doppelschnitt für Klonierungen) |
|-------------------------------|--|---|
| 10 x Restriktionsenzym-Puffer | 1 µl | 6 µl |
| Restriktionsenzym 1 | 0,1 µl | 1 µl |
| Restriktionsenzym 2 | - | 1 µl |
| DNA | ca. 0,02 µg | ca. 1 µg |
| <i>A</i> _{bidest} | ad 10 µl | ad 60 µl |

Tab. 4

Die Inkubation erfolgte bei leichtem Schütteln (300 rpm, 2 h) im Thermoblock mit Deckel bei optimaler Reaktionstemperatur des Enzyms nach Herstellerangabe (Fermentas bzw. Invitrogen).

2. 1. 5 Ligation der DNA

Bei der Ligation werden DNA-Teilstücke unterschiedlicher Herkunft miteinander verbunden. Das Annealing erfolgt an komplementären „sticky ends“ oder „blunt ends“ der DNA-

Fragmente. Die DNA-Ligase schließt unter ATP-Verbrauch die vorhandenen Stranglücken, sodass ein stabiles neues DNA-Molekül entsteht.

In dieser Arbeit wurden Ligationen mit 10 µl Gesamtansatz aus 7 µl DNA-Gemisch (Vektor- und Insert-DNA im molaren Verhältnis 1:3), 1 µl Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase durchgeführt. Die Proben wurden bei 16°C ü.N. im Thermocycler oder 2 Tage bei 4°C inkubiert und danach sofort zur Transformation eingesetzt.

2. 1. 6 Gel-Elektrophorese

Zur Herstellung des Agarosegels (B 1.3.1) wurde Agarose (0,5-2 % w/v je nach erwarteter Fragmentgröße) in TAE-Puffer durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, danach auf ca. 50°C abgekühlt und unter Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 15 µg/l) in eine passende Form gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel zur Verwendung in eine mit TAE-Puffer gefüllte Flachbett-Gel-Elektrophoresekammer gelegt.

Zur Elektrophorese wurde die zu analysierende DNA, z.B. ein PCR-Produkt oder Plasmid, jeweils mit einer geringen Menge 10x-Probenpuffer vermischt, in eine Geltasche pipettiert und 40 min im elektrischen Feld (600V/m) aufgetrennt.

Zur Kontrolle wurden, je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente, 5 µl einer 100 bp- oder 1000 bp-Leiter als Marker (B 1.5) an den Anfang jeder Gelzeile aufgetragen. Die Nukleinsäuren wurden durch anschließende Bestrahlung des Gels im Transilluminator mit UV-Licht sichtbar gemacht, da dieses das in den Nukleinsäuren eingelagerte Ethidiumbromid zur Fluoreszenz im rot-orangen Bereich (590 nm) anregt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit dem Molecular Imager ChemiDoc XRS.

Für eine analytische Gel-Elektrophorese reicht das so erhaltene Bild in der Regel aus. Soll jedoch präparativ DNA aus dem Gel aufgereinigt werden, empfiehlt sich eine möglichst kurze Expositionszeit von UV-Licht, da dieses zu Schäden an der DNA führen kann. Zur Aufreinigung wurde die gewünschte DNA-haltige Bande auf dem UV-Leuchttisch möglichst exakt mit dem Skalpell herausgetrennt und mit dem Gel-Spin-Kit (s. B 1.4) nach Herstellerangaben gereinigt.

2. 1. 7 Gen-Synthese

Das synthetische Gen genau definierter Sequenz wurde von Bio S&T (Lachine, Kanada) hergestellt, im *E. coli*-Laborstamm DH5α in das pUC57-Plasmid über die Schnittstellen *Hind*III und *Eco*RI inkloniert und als aufgereinigtes, lyophilisiertes Plasmid versandt.

2. 1. 8 RNA-Strukturanalyse

Um sicher zu stellen, dass in den mit optimiertem Codon-Bias simulierten Gensequenzen für die Impfstoffproteine Vol1 und Vol2 keine störenden mRNA-Strukturen während der Transkription entstehen können, erfolgte eine Faltungsanalyse der potenziellen mRNA-Produkte. Die dabei erkannten Stellen mit potenzieller Gefahr für langstreckige Haarnadelbildungen oder der Tendenz zur Dimer-Bildung wurden von Hand eliminiert. Dazu kamen die online verfügbaren Prädiktionsprogramme *GeneBee* (<http://www.genebee.msu.su/genebee.html>) des Belozersky Institute, Moskau, Russland, sowie *RNAFold* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) des Instituts für theoretische Chemie der Universität Wien (Gruber et al. 2008) zum Einsatz. Endgültige Strukturprädiktion und Entropie-Plot sind unter C 1.4 beschrieben.

2. 1. 9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung aller neu klonierten Produkte erfolgte bei der Firma AGOWA (Berlin). Die eingesandte Plasmid-DNA musste vorher mit A_{bidest} aus den Aufreinigungssäulen eluiert werden, um möglichst wenig Salze mitzuführen. Die optimale Konzentration für das Barcode-Sequenzieren lag nach Angabe von AGOWA bei 80 ng/ μl und wurde durch Verdünnen oder Eindampfen eingestellt. Schon vorpipettiert in die 10- μl -Probe wurde auch der gewünschte Sequenzierungsprimer in einer Endkonzentration von 5 pmol/ μl . Bei AGOWA erfolgte die Sequenzierung dann mit der Methode nach Sanger et al. (1977). Die Ergebnisse wurden mit dem Programm SeqMan aus dem DNASTar-Paket ausgewertet und mit den gewünschten Sequenzen verglichen.

2. 1. 10 Elektrotransformation

Unter Elektrotransformation versteht man das Einbringen von DNA in elektrokompente Zellen (Herstellung s. B 2.4.4) mittels Stromstoß (Dower et al. 1988). Man nimmt an, dass kurze elektrische Pulse eine vorübergehende Porenbildung in der Zellmembran bewirken (Elektroporation), so dass DNA-Moleküle in das Zellinnere gelangen können.

Elektrokompente Zellen wurden frisch aus -80°C geholt, 10 min auf Eis getaut, mit der zu transformierenden DNA gemischt, 5-10 min auf Eis inkubiert und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette übergeführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser II nach Angaben des Küvettenherstellers (Spannung 1,8 kV, Kapazität 25 μF , Entladungszeit 4-5 msec).

Kam es aufgrund zu hoher Salzkonzentration zum Durchschlag, wurde die Probe verworfen und die Elektroporation mit geringerem DNA-Gehalt erneut durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien rasch in ein Eppendorf-Röhrchen mit vorgewärmtem SOC-Medium transferiert, bei leichtem Schütteln 1 h bei 37°C inkubiert und danach im SOC-Medium 2 min bei 2000·g pelletiert. 100 µl des Überstandes sowie das gesamte Pellet wurden auf LB-Platten mit allen Antibiotika, gegen die eine Resistenz zu erwarten war, ausplattiert.

2. 1. 11 Ethanolpräzipitation von DNA

Die Ethanolpräzipitation dient zur Reinigung von DNA-Lösungen. Dazu wurde die Probe mit 10% (v/v) 40 mM Na-Acetat-Lösung versetzt. Nach Zugabe des 2,5-fachen Volumens an purem Ethanol wurde die DNA bei –20°C über 4-8 h oder ü.N. ausgefällt. Nach Zentrifugation (30 min, 21000·g, 4°C) wurde der Überstand dekantiert und das Pellet zur weiteren Verarbeitung in 5-50 µl A_{bidest} gelöst.

2. 2 Protein-Chemische Methoden

2. 2. 1 Struktur-Determination

Die lineare Sequenz eines Proteins wird als Primärstruktur bezeichnet. Sie enthält sämtliche nötige Information für die Raumstruktur des Proteins. Als Sekundärstruktur bezeichnet man den lokalen räumlichen Aufbau der Hauptkette. Klassische Sekundärstrukturelemente sind etwa die sehr stabile rechts gewundene α -Helix, als wichtigstes helikales Strukturmotiv aller Proteine, oder das parallele bzw. antiparallele β -Faltblatt. Sekundärstrukturen werden hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen in ihrer Form stabilisiert und sind meist durch kurze, relativ bewegliche freie Loops verbunden. Einen höheren Organisationsschritt stellt der vollständige dreidimensionale Aufbau eines Proteins, die Tertiärstruktur, dar. Sie wird durch eine Vielzahl verschiedener Wechselwirkungen stabilisiert, u.a. durch van-der-Waals-Kräfte, ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Manche Proteine weisen darüber hinaus noch kovalente Disulfidbrückenbindungen auf, welche die primär unter dem Einfluss nichtkovalenter Bindungen entstandene Struktur weiter stabilisieren. Lagern sich nun mehrere Untereinheiten mit definierter Tertiärstruktur zu einer Funktionseinheit zusammen, spricht man von Quartärstruktur.

Für die Arbeit mit Proteinen ist neben der meist bekannten Primär- die höhere, dreidimensionale Struktur von entscheidender Bedeutung, denn Letztere beeinflusst

maßgeblich die Eigenschaften des Proteins. Es ist aufgrund der bekannten Wechselwirkungen und relativ begrenzten Möglichkeiten der Sekundärstrukturen noch relativ einfach, diese mittels Computer zu simulieren. Wagt man sich jedoch an die Vorhersage der Tertiärstruktur, so stoßen einfache Methoden derzeit noch relativ schnell an ihre Grenzen.

Moderne computergestützte Simulationsmaschinen bedienen sich daher trainierter neuronaler Netze oder der Hidden-Markov-Modelle. Diese Systeme basieren auf einer Verkettung verdeckter stochastischer Vorgänge und ergeben am Ende ein bestimmtes Ergebnis. Diese Algorithmen enthalten per se noch nicht die Fähigkeit, eine Proteinstruktur vorherzusehen, sind aber „lernfähig“. Da es nun mittlerweile eine große Menge an Daten aus Röntgenstrukturanalysen gibt, besteht die Möglichkeit, Sequenz- und Strukturdaten, also mögliche Ausgangs- und Endwerte, für die Programme einzuspeisen. Damit können diese Systeme nun darauf trainiert werden, bestimmte Muster in der Proteinsequenz zu erkennen, die mit bestimmten dreidimensionalen Strukturen korrelieren. Dabei ist logischerweise das Ergebnis umso genauer, je mehr Daten zum Trainieren verwendet wurden und je mehr Stufen der „interne Entscheidungsfindungsprozess“ des Programms hat.

In dieser Arbeit kamen hauptsächlich über das Internet zugängliche, auf dem Hidden-Markov-Modell basierende Systeme zum Einsatz, weil diese die derzeit exakteste Struktursimulation erlauben. Bei sechs der sieben ausgewählten Virulenzfaktoren handelt es sich um Membranproteine in der äußeren Bakterienmembran (Quter Membrane Proteins: OMPs), die vermutlich eine Pore in Form eines β -Barrels bilden. Daher wurden hauptsächlich Prädiktionsprogramme verwendet, die auch mit OMPs trainiert worden waren.

Zum Einsatz kamen dabei folgende Programme:

- TM BETA (<http://psfs.cbrc.jp/tmbeta-net/>)
- PRED-TMBB (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/>)
- HMM-B2 TMR (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/biodec/>)
- Prof TMB (<http://cubic.bioc.columbia.edu/services/ProfTMB/index.html>)

Als Kontrolle für die Verlässlichkeit der Programme wurde die Struktur von zwei, den Virulenzfaktoren ähnlichen, OMPs prädiziert und anschließend mit den vorliegenden Röntgenstrukturdaten verglichen. Bei den Proteinen unbekannter Tertiärstruktur wurden die Ergebnisse der verschiedenen Programme per Hand abgestimmt und so eine recht genaue Vorhersage der Tertiärstruktur erzielt.

2. 2. 2 Epitop-Destination

Als Epitope werden hier kurze Sequenzen aus acht bis elf Aminosäuren bezeichnet, welche günstige Eigenschaften haben um in der Bindungstasche von MHC-I- oder MHC-II-Rezeptoren zu passen und T-Zellen präsentiert werden zu können.

Da aber die Gene für MHC-Rezeptoren beider Klassen einen hohen Genpolymorphismus aufweisen, der die Spezifität ihrer Epitopbindestellen beeinflusst, ist es nicht möglich, zuverlässige pauschale Aussagen über die Sequenz eines optimal präsentierbaren Epitops zu treffen. Jedoch kann man, genaue Kenntnis der Allele der MHC-Rezeptoren vorausgesetzt, für einen bestimmten Organismus relativ gute Vorhersagen über die Sequenz guter Epitope treffen. Hierbei kommen wieder computergestützte Verfahren zum Einsatz, die ähnlich den Proteinstruktur-Prädiktions-Programmen mit Hidden-Markov-Modellen oder neuronalen Netzen arbeiten (s. B 2.2.1).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Programm Rankpep (Reche et al. 2002, <http://bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP/>) verwendet. Da der Impfstoff auf die als Modell gewählte Balb/C-Maus optimiert werden sollte, wurden deren bekannte MHC-Gene für die Prädiktion der Epitope benutzt. Die Balb/C-Maus hat die MHC-I-Allele Kd, Ld und Dd sowie die MHC-II-Allele Ad und Ed. Für MHC-II-Epitope wurden nur Nonamere in die Überlegungen einbezogen, bei MHC-I-Epitopen Sequenzen aus acht bis elf Aminosäuren.

2. 2. 3 Proteasomen-Schnittmuster-Prädiktion

Damit Proteinfragmente der Länge von acht bis elf Aminosäuren auf MHC-Rezeptoren präsentiert werden können, muss vorher das „Träger-Protein“ in Bruchstücke abgebaut werden. Dies geschieht bei phagozytotisch aufgenommenen Proteinen vor allem durch lysosomale Enzyme. In der vorliegenden Arbeit wurde auf eine Simulation der Vorgänge im Lysosom verzichtet, da die dafür vorhandenen Simulationsmöglichkeiten als noch zu unzureichend erschienen.

Bei Proteinen im Zytoplasma geschieht der Abbau vor allem durch Proteasomen; das sind zytoplasmaständige, zylinderförmige Proteasomenkomplexe aus 28 Polypeptidketten mit insgesamt 14 aktiven Zentren, die in der Lage sind, Proteine erst unter Energieverbrauch zu entfalten und danach in Fragmente einer durchschnittlichen Länge von etwa zehn Aminosäureresten zu spalten.

Das Proteasom ist jedoch auch durch Stimuli, wie IFN- γ , in seiner Zusammensetzung veränderbar; es wird dann als Immunoproteasom bezeichnet und hat eine etwas veränderte Schnittfrequenz.

Beim Abbau werden die Proteine meist hinter basischen bzw. hydrophoben Aminosäuren zertrennt. Maßgeblich für immunologische Vorgänge sind am Proteasom vor allem die Schnittstellen, die das C-terminale Ende eines potenziellen Epitops bilden, da das N-terminale Trimming effizient durch Aminopeptidasen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) vor der MHC-I-Beladung durchgeführt werden kann (York et al. 2002). Damit wird klar, dass für die Präsentation von Epitopen auf MHC-I-Rezeptoren nicht nur alleinig die Sequenz des kurzen Peptidfragments, sondern auch die umliegenden Sequenzen von Bedeutung sind. Zur Auswahl der immunogensten Bereiche der Impfzielproteine wurden Schnittwahrscheinlichkeiten für das normale ebenso wie für das Immunoproteasom mittels der auf neuronalen Netzen basierenden Programme Net Chop und Rankpep (Reche et al. 2002) durchgeführt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/> und <http://bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP/>).

2. 2. 4 Proteinexpression

Die Überexpression von Proteinen im bakteriellen System mit dem Ziel, ausreichende Mengen für die Aufreinigung zu gewinnen, erfolgt in der Regel mit speziellen *E. coli* Expressionsstämmen, die mit einem für das gewünschte Protein codierenden Plasmid transformiert wurden. Diese sog. Expressionsplasmide besitzen meist einen unterdrückbaren Promotor, der es den Bakterien erlaubt, ganz normal zu wachsen, bis man durch Zugabe eines chemischen Stimulus den Promotor des Plasmids dereprimiert und somit die Proteinexpression induziert. Meist führt dies über kurz oder lang zum Wachstumsstillstand und sogar Tod der Bakterien, da die Expression außerordentlich stark ist, sehr viel Energie verbraucht wird und die tödliche Wirkung meist ab einer bestimmten Menge an Produkten einsetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Erzielung einer optimalen Proteinausbeute eine zytoplasmatische Proteinexpression mit den Vektoren pQE-30 und pASK-IBA37+ (s. B 1.9) durchgeführt. Dabei wurde, bedingt durch eine verstärkte Transkription, das Protein exprimiert. Der pQE-Vektor von Qiagen trägt einen T5/Lac-Promotor, der mit IPTG induzierbar und durch den Lac-Repressor reprimierbar ist. Jedoch ist der Lac-Repressor nicht auf dem gleichen Plasmid codiert, sodass als Expressionsstämme immer Bakterien benutzt werden, die den Lac-Repressor auf einem gesonderten Plasmid oder als chromosomale Kopie besitzen.

Der pASK-IBA-Vektor von IBA basiert auf dem Promotor des Tetrazyklin-Antibiotikaresistenzgens und trägt den benötigten Repressor selbst auf dem Vektor. Er lässt sich mit Anhydrotetrazyklin (AHT, s. B 1.10) in subinhibitorischer Konzentration induzieren. Die Expressionsplasmide wurden stets nach dem Klonieren mittels PCR und Sequenzierung überprüft. Es erfolgte eine Probeexpression für Vektoren mit dem IBA-System in *E. coli* DH5 α oder für das pQE-System in *E. coli* SCS110, da Letzterer einen chromosomal codierten Lac- Repressor besitzt. War die Probeexpression positiv, wurde das Expressionsplasmid in spezielle Expressionsstämme transformiert und darin exprimiert. Zum Einsatz kamen *E. coli* BL21 für IBA-Vektoren und der *E. coli*-Stamm M15 prep für pQE-Vektoren (s. B 1.12).

Die Induktionskultur wurde aus einer Ü.N.-Kultur angeimpft und unter ausreichender Antibiotikakonzentration bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C unter Schütteln angezchtet. Sodann erfolgte die Induktion beim pQE-Vektor mit IPTG (Endkonzentration 1 mM = 25 μ l Stocklösung pro 3 ml Kultur) bzw. bei IBA mit AHT (0,3 μ l Stocklösung pro 3 ml Medium). Die Kultur wurde für weitere 3-4 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nun erfolgte die Ernte der Zellen mittels Zentrifugation (4°C, 3800·g, 25 min). Das Bakterienpellet wurde zum großen Teil für die Proteinextraktion und Aufreinigung benutzt (B 2.2.7), ein kleiner Teil direkt mit Laemmli-Puffer (B 1.3.2) aufgekocht und als Kontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen (B 2.2.5).

2. 2. 5 SDS-Page (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese)

Mittels SDS-PAGE kann man Proteine gemäß ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld auftrennen (Laemmli 1970), vorausgesetzt, die Proteine wurden vorher denaturiert und ladungsmäßig angeglichen. Die Denaturierung geschieht durch 10-minütiges Kochen der Proteine mit SDS und β -Mercaptoethanol, welches Disulfidbrücken zwischen Cysteinen spaltet. Das Detergens SDS bricht Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine auf. Dabei binden die Dodecylsulfatanionen proportional zum Proteinmolekulargewicht wodurch alle Proteine eine gleiche negative Ladungsdichte erhalten. Im elektrischen Feld wandern sie zur Anode, und zwar umso langsamer je größer ihre Masse ist und trennen sich so auf. Zum Nachweis der Polypeptide kann man entweder sämtliche im Gel vorhandenen Proteine mit Coomassie-Blau färben oder mittels Immunoblot (B 2.2.6) gezielt bestimmte Proteine markieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Gele (s. B 1.3.2) kombiniert, um schärfere Banden zu erhalten. Zuerst wurden ca. $\frac{3}{4}$ einer Protran-II-Elektrophoresekammer mit dem angemischten Trenngel gefüllt. Um eine glatte Trennfläche zu erhalten und zum

Schutz gegen den Luftsauerstoff wurde das Trenngel mit Wasser überschichtet. Nach etwa 30-minütiger Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel in das restliche Volumen der Kammer gegossen und ein Kamm eingesetzt, damit im Sammelgel Taschen für den Proteinauftrag entstanden. Da die Puffer und Salzkonzentrationen von Sammel- und Trenngel unterschiedlich sind kommt es zu einem Sprung des elektrischen Feldpotentials an den Geltrennflächen was zur Schärfung der Proteinbanden führt.

Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel entweder sofort verwendet oder in feuchte Tücher eingeschlagen und bei 4°C aufbewahrt. Die zu analysierenden Proteinproben wurden in Laemmli-Puffer und Stopmix (B 1.3.2) gelöst, 5 min aufgekocht, auf Eis schockgekühlt und direkt mittels Hamiltonspritze in die Taschen des Sammelgels verbracht. Normalerweise wurde als Größenstandard für die Proteine die PageRuler Protein Ladder (Fermentas) benutzt; nur für Westernblots (B 2.2.6) wurde die PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) eingesetzt, weil deren Bestandteile schon vorgefärbt und somit immer sichtbar sind. Dies erlaubt die unmittelbare Kontrolle über den Proteinübertrag auf die Nitrozellulosemembran beim Western-Blot. Die Elektrophorese wurde bei 20-50 mA im Puffer nach Laemmli 30 min lang (bzw. bis die Proteine völlig durchgelaufen waren) durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele unter leichtem Schütteln 10-30 min in Coomassie-Blau und anschließend 3-6 h in der Entfärbelösung oder ü.N. in A_{bidest} bzw. Leitungswasser auf dem Schütteltisch inkubiert.

2. 2. 6 Immunoblot/Western-Blot/Dot-Blot

Der Western Blot, auch Immunoblot genannt, ist eine Methode zur spezifischen Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antigen-Antikörper-(AK)-Reaktion (Towbin et al. 1979). Als Antigene fungieren die Epitope der Proteine, die man einem monoklonalen oder auch einem polyklonalen AK-Gemisch aussetzt. Dazu werden die aufgetrennten Proteine vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, wo sie irreversibel binden. Vor Inkubation dieser Membran mit dem ersten AK blockt man zur Verhinderung unspezifischer Bindungen die freien Valenzen mittels Blockierungspuffer. Man wäscht mehrmals und trägt dann den zweiten AK auf, der spezifisch an den ersten bindet. Die Bindung des zweiten, enzymgekoppelten AKs an das entsprechende Protein gestattet dessen Detektion nach Zugabe eines geeigneten Substrats.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine nach Auftrennung in der SDS-Gel-Elektrophorese mit einer Spannung von 90 V 60 min lang in einer Feuchtkammer auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Beim einfacheren Dot-Blot wurden die Proteine in Puffer

einfach auf eine Nitrozellulosemembran getropft und bei RT für ein paar Stunden antrocknen gelassen. Dadurch werden die Proteine, ebenso wie beim elektrophoretischen Übertrag auf die Membran, auf der Nitrozellulose fixiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran ü.N., mindestens jedoch für 2 h, in einer Lösung mit 2% (w/v) Magermilchpulver geblockt. Danach wurde die Membran 1,5-2 h mit dem ersten AK, hier in der Regel mit m45-Hybridoma-Zellkulturüberstand, in TBS-T 1:500 verdünnt, bei RT und leichtem Schütteln inkubiert, anschließend viermal 5 min mit TBS-T gewaschen. Der zweite AK (z.B. Anti-Maus- IgG-IgM AP, s. B 1.6) wurde in TBS-T 1: 5000 verdünnt und analog für 2 h aufgegeben. Danach wurde die Membran viermal je 5 min mit TBS-T, danach einmal mit A_{bidest} gewaschen. Das nach Angaben des Herstellers angemischte Detektionsreagens, wurde in der Hand leicht angewärmt, auf den Blot aufgebracht und dort unter leichtem Schütteln 10 min belassen. Die Nitrozellulosemembran wurde entnommen, abgetropft und in einer Röntgenkassette in der Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm gelegt. Es wurde eine Belichtungsreihe mit 15 sec, 1 min, 3,5 min und bei Bedarf noch längerer Belichtungszeit angefertigt. Alle Filme wurden im Röntgenfilmentwicklungsgerät entwickelt und für die weitere Analyse in den Computer eingescannt.

2. 2. 7 Proteinaufreinigung mit His-tag

Proteine wurden erstmals von Porath et al. (1975) durch Chromatographie mittels Metall-Chelatkomplex gereinigt, allerdings waren damals Ausbeute und Reinheitsgrad noch sehr gering. Hocheffizient gelingt das Aufreinigen rekombinanter Proteine erst mittels His-tag® (Hexahistidin-tag oder 6xHis-tag, entwickelt bei Roche, Vertrieb Qiagen) und Ni-NTA-Technik (Nickel-Nitrilotriacetic Acid). Da der zugrunde liegende Mechanismus nur von der Primärstruktur des Proteins abhängt, kann die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen erfolgen. Im Bakterium wird über den pQE-Vektor an das N-terminale Ende des gewünschten Proteins das 6xHis-tag platziert. Diese repetitiven Histidinsequenzen binden sehr leicht an die zwei freien Bindungsstellen am zentralen Ni-Ion (Koordinationszahl 6) des Ni-Chelatkomplexes mit den vier NTA-Liganden. Die Ni-NTA-Matrix bindet das mit 6xHis-tag besetzte Protein sehr fest, auch unter strigenten Waschbedingungen (Hochuli 1989, Janknecht et al. 1991). Das 6xHis-tag ist bei pH 8,0 klein und ungeladen und beeinflusst daher in der Regel weder Struktur noch Funktion des zu reinigenden Proteins, wie für viele Proteine, inklusive Enzyme und Impfstoffe, gezeigt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Ni-NTA Spin Kit mit Säulen (B.1.4) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die pro Mikrozentrifugenröhrchen enthaltene Matrix aus makroporösem Silikatmaterial unterdrückt nichtspezifische hydrophobe Interaktionen.

Zur Zellgewinnung wurden 10 ml Bakterienkultur ins Zentrifugenröhrchen gefüllt und nach einmaliger Zentrifugation (10 min, 3800·g) der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 1ml Lysepuffer B (s. B 1.3.4) unter Vortexen und Vermeiden von Schaumbildung resuspendiert. Die nach etwa 1 h opak-durchsichtige, komplett lysierte Bakterienlösung wurde, um die zellulären Bestandteile zu entfernen, erneut zentrifugiert (20 min, 2.000·g) und der Überstand in ein frisches Röhrchen übergeführt. Die Ni-NTA-Säule wurde mit 600 µl Puffer B zentrifugiert (2 min, 2000·g), um sie zu equilibrieren. Die lysierte Bakterienkultur wurde in Portionen zu 600 µl nach und nach durch die Säule zentrifugiert (je 2 min, 2000·g). Der Säulendurchfluss wurde als Kontrolle sichergestellt. Um unspezifisch gebundene Proteine aus der Säule auszuwaschen, erfolgten zwei Zentrifugationsschritte (2 min, 2000·g) mit jeweils 600 µl Puffer C (B 1.3.4). Auch dieser Durchfluss wurde aufbewahrt und auf ein SDS-Gel aufgetragen, um festzustellen, ob das gewünschte aufzureinigende Protein nicht aus Versehen ausgewaschen worden war. Um das gebundene Protein zu eluieren, wurde die Säule zweimal mit je 200 µl Puffer E (B 1.3.4) zentrifugiert (2 min, 2000·g). Dabei war meist in der ersten Fraktion die Hauptmenge an Protein enthalten.

2. 2. 8 TCA-Präzipitation von Überständen

Unter der TCA-Präzipitation versteht man das Ausfällen von Proteinen mittels 10%-iger Trichloressigsäure. Zur Gewinnung von Typ-III-sezernierten Proteinen im Überstand, wurde aus einer ü.N.-Kultur von *Salmonella enterica* S. Thyphimurium (37°C, Schüttelinkubator) eine 10-ml-Kultur in stark salzhaltiges LB-Medium (300 mM NaCl) 1:40 verdünnt angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 hochgezüchtet. Die Bakterien wurden mit 3.840·g 20 min bei 4°C abzentrifugiert und das erhaltene Bakterienpellet in 1 ml 0,9% NaCl aufgenommen und für weitere Analysen bei -20°C eingefroren. Der Überstand wurde sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm), und die sezernierten Proteine mit TCA (Endkonzentration 10% v/v) auf Eis für mindestens 2 h ausgefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 20.800·g und 4°C wurden die als leichter „Schleier“ an der Wand des Zentrifugenröhrchens haftenden Proteine vorsichtig in 1 ml PBS (pH 7,4) resuspendiert. Nach Zugabe von 40 % des ursprünglichen Volumens an eiskaltem Aceton, um die TCA zu entfernen, wurden sie erneut über 1 h lang auf Eis ausgefällt. Nach Zentrifugation (30 min, 20.800·g) wurde das gewonnene Pellet in 1 ml Aceton suspendiert, in ein Eppendorfröhrchen übergeführt und 3-5

min bei 20.800·g erneut zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstands wurde das Proteinpellet 3 min durch Vakuumzentrifugation getrocknet, sodann in 50 µl 50 mM Tris (pH 8) resuspendiert und entweder sofort in der SDS-PAGE eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

2. 3 Zellkultur- Methoden

2. 3. 1 Wachstumsbedingungen, Passagieren und Splitten

Die verwendeten Zellen (s. B 1.11) wurden im Zellkulturbrutschrank bei 37°C in 5% CO₂ bei 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert, wo sie an der Oberfläche des Bodens von T-75-Flaschen aus Polystyren (Nunc) anwuchsen. Auf dem 75 cm² großen Flaschenboden befinden sich nach Bildung einer konfluenten einzelligen Schicht (Zellmonolayer) ca. $8,4 \cdot 10^6$ HCV29-Zellen. Etwa jeden zweiten Tag wurde das Medium (20 ml pro Flasche) erneuert, indem der gesamte Kulturüberstand abgesaugt und durch ein auf 37°C vorgewärmtes, supplementiertes RPMI-Medium (PAN Biotech) ersetzt wurde. Sämtliche Tätigkeiten im Zusammenhang mit Zellkulturen wurden in der Sterilwerkbank (Laminar Air Flow) durchgeführt.

Unter den oben beschriebenen Bedingungen verdoppelt sich die Zahl der HCV29-Zellen ca. alle 24-36 h. Etwa ein- bis zweimal pro Woche wurden die Zellen nach Bildung eines konfluenten Monolayers am Flaschenboden in neue Flaschen oder Wells eingesät. Durch Inkubation in 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung je Flasche (5 min, 37°C) wurden Adhäsionsproteine der Zelloberfläche gespalten. So ließen sich die Zellen nun leicht durch Klopfen an die Flaschenseite vom Untergrund lösen. Trypsin-EDTA wurde durch Zugabe von 10 ml Medium inaktiviert, zentrifugiert (3800·g, 5 min, 20°C), das Pellet wieder in 10 ml Medium aufgenommen und je nach Bedarf in neue Wells bzw. Flaschen mit vorgewärmtem Medium gemäß **Tab. 5** eingesät. Mit den Bl6-F10 Zellen wurde analog verfahren.

| Gefäß | | Oberfläche: [mm ²] | Eingesäte Zellen pro Gefäß: | Konfluente Zellen pro Gefäß: | Trypsin: [ml] | Medium: [ml] |
|--------------|----|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------|-----------------|
| Well | 6 | 962 | $0,30 \cdot 10^6$ | $1,20 \cdot 10^6$ | 2 | 3-5 |
| | 12 | 401 | $0,10 \cdot 10^6$ | $0,40 \cdot 10^6$ | 1 | 1-2 |
| | 24 | 200 | $0,05 \cdot 10^6$ | $0,20 \cdot 10^6$ | 0,5 | 0.5-1 |
| T-25 Flasche | | 2500 | $0,70 \cdot 10^6$ | $2,80 \cdot 10^6$ | 3 | 3-5 |
| T-75 Flasche | | 7500 | $2,10 \cdot 10^6$ | $8,40 \cdot 10^6$ | 5 | 10-20 |

Tab. 5

2. 3. 2 Produktion monoklonaler Antikörper mittels Hybridomazellen

Die m45-Maushybridoma-Zellen, die AK gegen das Influenzavirus Hämagglutinin Epitop m45 produzieren, wurden in RPMI-Medium mit Pen/Strep (s. B 1.13.3) kultiviert. Die wenig adheränten Hybridomazellen wurden anders als die übrigen benutzten Zellkulturen beim Splitten nicht trypsiniert, sondern gleich mitsamt dem Medium abgesaugt. Das Pellet kann so einfach durch Zentrifugation gewonnen werden. Beim Passagieren wurde das verbrauchte Medium inklusive eines Großteils der Zellen abgesaugt und verworfen. Die alte Flasche konnte danach erneut mit Medium befüllt werden und der Anteil der adheränten Zellen reichte aus, um in der Flasche erneut hochzuwachsen. Zur AK-Produktion wurden die Hybridomazellen in T-25-Flaschen in 25 ml nicht supplementiertem RPMI ohne Antibiotika-Zusatz eingesät und kultiviert, bis mehr als die Hälfte der Zellen abgestorben war. Danach konnte der AK-haltige Überstand nach Abzentrifugieren der Hybridomazellen (400·g, 5 min, 20°C) gewonnen und frisch benutzt oder aliquotiert bei -20°C eingefroren werden.

2. 3. 3 Kryokonservierung

Einfrieren: Die in der Anzuchtflasche hochgewachsenen Zellen wurden beim Splitten nach dem Trypsinieren abgesaugt und zentrifugiert (3800·g, 5 min, 20°C).

Das Pellet wurde in 500-1000 µl einer Lösung aus 90 % FKS mit 10 % DMSO aufgenommen und in Kryo-Röhrchen eingefüllt. In einer mit Isopropanol gefüllten Kühlschüssel wurden die Zellen im Tiefkühlschrank langsam heruntergekühlt. Die Kühlschüssel wurde 2-3 Tage bei -80°C in der Tiefkühltruhe belassen, danach in flüssigen Stickstoff umgesetzt.

Auftauen: Das Kryo-Röhrchen wurde aus dem flüssigen Stickstoff geholt und sofort mittels Hand oder Wasserbad auf 37°C erwärmt. Um eine Kontamination zu vermeiden, berührten Hand oder Wasser den Deckel und Deckelring nicht. Nach dem Auftauen wurde abzentrifugiert (3800·g, 5 min, 20°C), die Zellen wurden in vorgewärmtem Medium resuspendiert und danach in eine neue vorgewärmte Flasche eingebracht. Während der folgenden Ruhephase wurden die Zellen nicht bewegt, damit sie in Ruhe anwachsen konnten.

2. 3. 4 Bestimmung der Anzahl lebender Zellen

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen pro ml Nährmedium wurde ein Aliquot des Mediums mit Zellen im Verhältnis 1:3 mit Trypanblau 0,5% versetzt (50 µl Trypanblau ad 150 µl Zellkulturmedium, s. B 1.13.1). Tote Zellen werden so blau gefärbt. In einer Neubauer-Zählkammer ließen sich dann die ungefärbten, also lebenden Zellen unter dem Mikroskop abzählen und auf das gesamte Zellmedium hochrechnen: Ihre Zahl pro mm²

Zählquadrat wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors mit 10^4 multipliziert und lieferte die Anzahl lebender Zellen pro ml Medium.

2. 3. 5 Extrazellulärer Gentamicin-Kill-Assay

Für Infektionsversuche wurden die HCV29 (humane immortalisierte Urothelzellen) - oder Bl6-F10-(Mausmelanoma)-Zellen in Polysteren-Mikrotiterplatten eingesät. Für Mikrotiterplatten mit sechs Vertiefungen (Wells) erwiesen sich etwa $0,5 \cdot 10^6$ Zellen als optimal. Die Anzahl der Zellen wurde, wie unter B 2.3.4 beschrieben, bestimmt.

Die Zellen wurden im Anschluss für 24 h mit RPMI, 10 % FKS, und für weitere 24 h mit purem RPMI inkubiert. Vor der Infektion mit *Salmonella* Typhimurium wurden die Zellen noch einmal mit 1000 μ l PBS je Well gespült. Alle Wells wurden gleichzeitig mit $2,2 \cdot 10^7$ KBE infiziert und während der Infektion in 1 ml RPMI im 6-Well-Plate bei 37°C im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Nach 2-maligem Abspülen mit PBS wurden in die Vertiefungen 2 ml mit 100 μ g/ml Gentamycin (Gm, B 1.13.3) versetztes pures RPMI gegeben und dort 30 min belassen, um die extrazellulären Bakterien abzutöten. Danach wurde das Gm-haltige Medium abgesaugt und abzentrifugiert (5000·g, 5 min), das Pellet mit toten Bakterien in 50 μ l PBS resuspendiert und zur Kontrolle des vollständigen Abtötens extrazellulärer Bakterien auf einer Blutplatte ausplattiert. Die infizierten Zellkulturen wurden zweimal mit je 1000 μ l PBS gespült, um Gm-Reste zu entfernen. Sodann wurden die Zellkulturzellen mit 300 μ l PBS mit 0,1 % TritonX-100 für 2 min lysiert und die noch haftenden Zelltrümmer abgeschabt. Das Lysat wurde in Verdünnungsreihen ausplattiert, um die Anzahl intrazellulärer Bakterien zu bestimmen.

2. 3. 6 Anzucht für Immunfluoreszenz-Färbung auf Glasobjektträger

Die Zellen der Kultur für die Immunfluoreszenz-Färbung wurden in 24-Well-Plates mit einem runden Deckgläschen am Boden gemäß **Tab. 5** in 2.3.1 angesät. Dort wurden sie 24 h in RPMI+10 % FKS und danach weitere 24 h in RPMI inkubiert. Vor der Infektion mit *Salmonella* Typhimurium wurden sie mit PBS gespült, um Reste des Mediums auszuwaschen. Die Infektion selbst erfolgte in 200 μ l PBS (24-Well-Plate) für 20 min im Zellkultur-Brutschrank bei 37°C. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die nicht adhärenen Salmonellen mit PBS entfernt. Da die Zellen nur oben auf den Glasplättchen, nicht jedoch nach unten hängend anwachsen, konnten die Glasplättchen mitsamt den auf der Oberseite befindlichen, infizierten Zellen entnommen und gemäß dem Protokoll für die Fluoreszenzfärbung weiterbehandelt werden.

2.3.7 Immunfluoreszenzfärbung und –mikroskopie

Zur Identifizierung bestimmter Zell- oder Organstrukturen und/oder deren Lokalisation in der Zelle, wird die nachzuweisende Struktur (Antigen) zunächst mit einem ersten Antikörper (AK) markiert. In der Regel wird danach ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. grünes FITC, rotes TRITC) verbundener zweiter AK spezifisch an den ersten gebunden. Mit Hilfe des Farbstoffs kann dann unter dem Immunfluoreszenz- oder konfokalen Laserscanning-Mikroskop die Struktur in subzellulärer Auflösung sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe der Mehrfachimmunfluoreszenz können Strukturen mit unterschiedlichen Immunfluoreszenz-Farbstoffen gleichzeitig angefärbt werden.

Mit dieser Methode wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl Salmonellen als auch m45-markierte Typ-III-Effektor-Proteine und deren Lokalisation in der Zelle sichtbar gemacht.

Nachdem die Zellkulturen gemäß Protokoll (B 2.3.6) auf Glasplättchen angezüchtet und gewaschen worden waren, wurden sie 10 min lang bei RT in 3,7 %igem Formaldehyd fixiert. Sodann erfolgte ein 3-facher Waschschrift in PBS und die 20-minütige Inkubation mit 50 mM NH_4Cl -Lösung zum Blockieren freier reaktiver Aldehydgruppen oder unvollständig quervernetzter Aldehyde. Um die Zellmembran für die AK durchgängig zu machen, wurden die fixierten Zellen bei RT für 3 min in 0,1% (v/v) Triton X-100-Lösung gehalten. Auch nach diesem Schritt erfolgte eine 3-fache Behandlung in PBS, anschließend die Blockierung der unspezifischen Proteinbindungsstellen mittels 3% (w/v) BSA in PBS für 1 h. Die beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären AK wurden zeitgleich in 3% BSA (w/v) PBS mit den Verdünnungen 1:1 (monoklonaler Maus-Anti-m45) bzw. 1:50 (monovalentes Kaninchen-Anti-O4 Salmonellen Serum) auf die permeabilisierten Zellen aufgegeben und 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS und einmaligem Waschen in PBS mit 3% BSA (w/v) für 3 min, wurde FITC-konjugiertes Ziege-Anti-Maus Serum (Anti-Maus FITC) 1:400 in PBS 3% (w/v) BSA verdünnt für 1 h bei RT auf den Zellen inkubiert. Ungebundene FITC-markierte AK wurden durch einen dreimaligen PBS-Waschschrift entfernt und es folgte die Inkubation mit dem TRITC-markierten zweiten Sekundär-AK analog, ebenfalls 1:400 verdünnt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Dazu wurden die Präparate einfach für 5 min bei RT in 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI-Lösung gehalten. Als letzter Schritt erfolgte eine zweimalige Inkubation (je 2min) in PBS. Nach kurzem Abtropfen der Deckgläschen, wurden sie mit den fixierten Zellen nach unten auf einen Objektträger mit Mowiol-Tropfen (B 1.3.7) gekippt und ü.N. bei 4°C zum Aushärten aufbewahrt. Am nächsten Morgen konnten die Präparate mit Nagellack abgedichtet und unter dem Mikroskop betrachtet werden.

2. 4 Bakterien-Kulturen

2. 4. 1 Gewinnung von Bakterienkulturen definierter Keimzahl

Bakterien-Stämme wurden bei 37°C in mit entsprechenden Antibiotika (Selektionsdruck) versetztem LB-Medium (B 1.13.2) in Schüttelinkubatoren angezüchtet. Das Wachstum wurde, falls notwendig, durch regelmäßige Dichtebestimmung im Fotometer kontrolliert. Nach Erreichen der gewünschten Dichte wurde die Kultur abzentrifugiert, gewaschen und das Pellet in 25 %igem Glycerin wieder aufgenommen. Diese Lösung wurde aliquotiert und bei -80° eingefroren. Nach einem Tag wurde ein Aliquot aufgetaut, wie für den gedachten Einsatz behandelt und anschließend eine Verdünnungsreihe ausplattiert.

2. 4. 2 Kryokonservierung der Bakterienkulturen

Zur Konservierung von Bakterienklonen oder Lösungen bestimmter Bakteriendichte bei -80°C wurden die Kulturen abzentrifugiert und in 25 %igem Glycerin in A_{bidest} wieder aufgenommen. Das enthaltene Glycerin verhindert die Bildung großer Kristalle, sodass die Bakterien das Einfrieren und Auftauen besser überleben.

2. 4. 3 Selektion von Bakterien auf Antibiotikaresistenz

Zur Selektion von Bakterienklonen auf Resistenzen wurden selbst gegossene LB-Agar-Platten benutzt. Der Agar (1,5 % w/v) wurde aufgeköcht, bei einer Temperatur von unter 50°C mit den gewünschten Antibiotika versetzt und dann in Petrischalen gegossen.

Wenn Bakterien auf Platten kultiviert wurden, waren immer alle notwendigen Antibiotika in den Platten enthalten, um dem Verlust von Plasmiden und um Verunreinigungen vorzubeugen.

2. 4. 4 Herstellung elektrokompenter *E. coli* und *Salmonella enterica*

Die Bakterienzellen wurden ü.N. in wenig LB-Nährmedium (B 1.13.2) eingebracht, wenn möglich mit Antibiotikazusatz, und morgens im Schüttler bei geeigneter Temperatur durch Verdünnen im Verhältnis 1:200 in ein größeres Volumen übergeführt. Erreichte die Bakteriensuspension eine OD₆₀₀ von 0,5, wurde sie sofort auf Eis gestellt und in einer gekühlten Zentrifuge 3800·g mindestens 20 min lang pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Bakterienpellet mit eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt, wobei das letzte Mal mit eiskaltem A_{dest} mit 10 % (v/v) Glycerol gewaschen wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet im letzten Tropfen resuspendiert und rasch in vorgekühlten Zentrifugenröhrchen

aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Zur Verwendung als elektrokompetente Zellen wurden sie frisch aus der Kühltruhe geholt und 10 min auf Eis aufgetaut (Hanahan 1983).

2. 5 Immunologische Methoden

2. 5. 1 Antikörper-Titer-Bestimmung mit ELISA (Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay)

Der ELISA ist ein, durch eine enzymatische Farbreaktion verstärktes, hochsensibles immunologisches Nachweisverfahren. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Proteinkonzentration.

In der vorliegenden Arbeit wurde damit der AK-Titer, untergliedert nach Klassen (IgG/IgM vs IgA), in von der Maus gewonnenen Proben (s. B 2.6.3-5) mittels klassenspezifischem ELISA bestimmt.

In die Vertiefungen der MaxiSorb-96Well-Mikrotiterplatten wurde eine Lösung aus Beschichtungspuffer (B 1.3.5) mit $30\ \mu\text{g/ml}$ rekombinantes Protein/Antigen pipettiert und die Platten wurden damit 2 h bei 37°C bzw. ü.N. bei 4°C beschichtet. Zur Absättigung der freien Bindungsstellen wurden die Platten vor Verwendung 30 min bei 37°C mit $200\ \mu\text{l}$ 1 % (w/v) BSA in PBS pro Well inkubiert. Im nächsten Schritt wurden Verdünnungsreihen von Mausproben in 3% (w/v) BSA in PBS in die Wells pipettiert, 2 h bei 37°C belassen und so die eventuell enthaltenen spezifischen AK quantitativ an das fixierte Protein gebunden. Um nicht gebundene, unspezifische AK auszuwaschen, wurde danach viermal 10 sec und einmal 5 min lang mit $200\ \mu\text{l}$ TBS-T pro Well gewaschen. Danach wurde der mit alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelte zweite AK (B 1.6), der spezifisch an die Maus-AK der gewünschten Klasse bindet, ebenfalls 2 h bei 37°C im Well belassen (AK 1:1000 3 %iges BSA in PBS). Nach erneutem Waschen (s.o.) wurden $50\ \mu\text{l}$ Entwicklungslösung (B 1.3.5) je Napf eingesetzt. Durch die AP kommt es nun nur in den Vertiefungen mit gebundenen Antikörpern zu einem Farbumschlag. Nach ca. 1-stündiger Inkubation bei RT wurde die Substratumsetzung durch Zugabe von Natronlauge ($50\ \mu\text{l}$ 0.1N NaOH) gestoppt. Durch Messung der Absorption bei 405 nm (Referenzwellenlänge 535nm) im ELISA-Reader wurde das Ausmaß des Farbumschlags jeder Probe bestimmt.

2. 5. 2 ELISpot Assay

Der ELISpot Assay, eine modifizierte ELISA-Technik, wurde zur Bestimmung der Anzahl von Interferon-gamma (IFN- γ) sezernierenden T-Zellen aus einer bestimmten Menge an Leukozyten der Milz verwendet. Die Milzzellen immunisierter und scheinimmunisierter Mäuse (31. Tag) wurden mit entsprechendem Impfstoffprotein in vitro restimuliert und so zur

Bildung von IFN- γ angeregt. Dies wurde durch eine spezifische Farbreaktion der IFN- γ produzierenden Zellen (Spots) auf einer Trägermembran nachgewiesen.

Den Mäusen wurde die Milz unter aseptischen Bedingungen entnommen und in je 5 ml Medium (RPMI mit 10% (v/v) FKS und Pen/Strep) gegeben. Jede Milz wurde im Laminar Air Flow unter sterilen Bedingungen mit einem Stößel homogenisiert, mit Kultursuspension durch ein Zellsieb gespült und anschließend in einer vorgewärmten Zentrifuge (Sorval) bei 20°C 10 min bei 380·g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellsediment im letzten Tropfen resuspendiert.

Die Erythrozyten wurden durch 5-7-minütiges Einwirken von 2 ml NH₄Cl-Lösung (150 mM, pH 7,4) lysiert und die Lyse durch Zugabe von 5 ml Medium (s.o.) nach 5 min beendet. Durch erneute Zentrifugation (8 min, 20°C, 430·g) wurde ein Zellsediment gewonnen, das im letzten Tropfen resuspendiert und in 5 ml Medium aufgenommen wurde. Die Zellen wurden bei leicht geöffnetem Deckel in den Brutschrank gestellt.

Die Konzentration der Milzzellenkulturen (s. B 2.3.4) wurde mit 10 μ l Zellsuspension und 90 μ l Trypanblau 0,5% in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die gewünschte Zellzahl von $1,5 \cdot 10^6$ Lymphozyten in 100 μ l wurde jeweils durch Zentrifugation bzw. Verdünnen eingestellt.

Zur Vorstimulation wurden für jede Milzzellenkultur vier Ansätze gemacht, d.h. es wurden je 100 μ l Zellen in Medium plus je 50 μ l Antigen (0,5 mg/ml) bzw. reines Medium oder Serum-Albumin (als Negativkontrolle, 0,5 mg/ml) sowie ConA (als Positivkontrolle 45 μ g/ml) in 96-Well-Plates eingebracht und 4 h in den Brutschrank gestellt.

Inzwischen wurde die Nitrozellulosemembran der ELISpot-Mikrotiterplatten (96-Well Silent Screen Plates, NUNC) 1:500 mit Anti-IFN- γ -AK und Pufferlösung (Gemisch aus A_{dest}, Puffer A und B, s. B 1.3.5, 50 μ l pro Well) beschichtet und 2 h bei 37°C inkubiert, damit die AK an die Membran binden konnten. Sodann wurden die Platten 4-mal je 5 min mit je 200 μ l A_{bidest} gewaschen, 50 μ l RPMI pro Well aufgebracht und die Platten 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Vorstimulation wurden 100 μ l aus den genannten vier Ansätzen auf die 50 μ l Medium gegeben und die Mikrotiterplatten 12-18 h bei 37°C im Brutschrank erschütterungsfrei inkubiert.

Nach Entfernen der Zellen und 10-maligem Waschen mit 200 μ l Waschpuffer (B 1.3.5) wurde der Sekundär-AK, Anti-IFN- γ (Biotin-gekoppelter Anti-Maus-IFN, s. B 1.6) in PBS + 1% BSA, zur Detektion zugegeben (50 μ l pro Well mit einer Konzentration von 2 μ g AK/ml) und ca. 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde 5-mal mit 200 μ l Waschpuffer je Well gespült, sodann wurden 50 μ l HRPO₄-Streptavidin-Konjugat aufgegeben. Nach 2 h Inkubation bei RT

wurde erneut wie oben mit Waschpuffer gespült. Daraufhin wurden als Substrat für die Farbreaktion pro Well 50 µl AEC-DMF-Lösung (s. B 1.3.5) eingesetzt und die Reaktion nach 30 min bei RT mit Leitungswasser wieder gestoppt. Die auf den ü.N. getrockneten Platten erschienenen roten Punkte wurden nach Einscannen in den Computer ausgezählt.

2. 5. 3 FACS-Messung mit Miltenyi Magnetseparation, CD4- und CD8-Zellen

Um zu bestimmen, ob sich unter den im ELISpot quantifizierten IFN- γ sezernierenden reaktiven T-Zellen aus der Milz T-Helfer- und T-Killer Zellen befinden, wurden restimulierte Zellen mittels Durchflusszytometrie näher untersucht. Dazu wurden die Zellen analog zum ELISpot restimuliert und mit divalenten AK bedeckt, die es erlauben diejenigen Zellen die IFN- γ ausscheiden zu markieren. Als zweite Färbung erfolgte dann die Markierung auf die Hilfsrezeptoren CD4 oder CD8 zur Identifizierung der Subpopulationen.

Es wurden stets Zellen aus der gleichen Milzzellpopulation benutzt, die auch für den ELISpot zum Einsatz kam, daher beginnen beide Versuche absolut gleich und wurden auch gleichzeitig durchgeführt.

Nachdem die Milzen wie beschrieben (B 2.5.2) steril entnommen, die Zellen durch ein Zellsieb homogenisiert und die Erythrozyten lysiert worden waren, wurden die Zellen für den Einsatz im ELISpot ausgezählt. Von den für den ELISpot in der Konzentration ausgezählten Milzzellsuspensionen wurden $2 \cdot 10^7$ Zellen in 2000 µl Zellkulturmedium (RPMI+FKS+Pen/Strep) aufgenommen und für jede Stimulationsgruppe in eine 12er-Mikrotiterplatte pipettiert.

2. 5. 3. 1 Stimulation der Zellen

Zur Stimulation wurden entweder Puffer, BSA oder die Impfstoffproteine Vol1 respektive Vol2 eingesetzt (s. **Tab. 6**).

| Stimulation: | Stocklösung [µl] | Puffer [µl] | Medium [µl] | Endkonzentration |
|--------------|------------------|-------------|-------------|------------------|
| Vol1 | 53 | - | 613 | 0,5 mg/ml |
| Vol2 | 60 | - | 606 | 0,5 mg/ml |
| Puffer | - | 58 | 608 | 0 mg/ml |

Tab. 6

Zur optimalen Antigenpräsentation wurden jeweils 12er-Mikrotiterplatten mit 2 ml Gesamtvolumen an Zellen/Puffer benutzt. Die Stimulationsproteine wurden für 12-16 h auf den Zellen im Zellkultur-Brutschrank (37°C; 5 % CO₂) belassen, um eine Aktivierung zu ermöglichen.

Werden T-Zellen aktiviert, so sezernieren diese IFN- γ . Diesen Effekt nutzt man beim oben beschriebenen IFN- γ -ELISpot auch aus. Allerdings kann man beim ELISpot nur das Vorhandensein IFN-g sezernierender Zellen nachweisen und diese auszählen, nicht jedoch sagen, um welchen Zelltyp es sich dabei handelt. Um diese Zellen zu identifizieren, müssen sie zuerst aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte mittels cell scraper auf Eis gerntet und in 22 ml eiskaltem FACS-Puffer in einem 50-ml-Falcon-Röhrchen suspendiert werden, um sie zu waschen. Durch diese zwei Waschschrte (22 ml eiskalter FACS-Puffer beim ersten, 20 ml beim zweiten Mal) wird das im Überstand vorhandene freigesetzte IFN- γ ausgewaschen. Um die Zellen nicht zu beschädigen, wurde die Zentrifugation schonend bei 4°C für 10 min bei 300·g durchgeführt.

Danach wurden die sedimentierten Zellen in 160 μ l kaltem Medium und 40 μ l IFN-g *Catch Reagenz* resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert, um alle T-Zellen (CD45 positiv) mit den divalenten AK gegen IFN- γ (Miltenyi) zu beladen (s. **Abb. 4**).

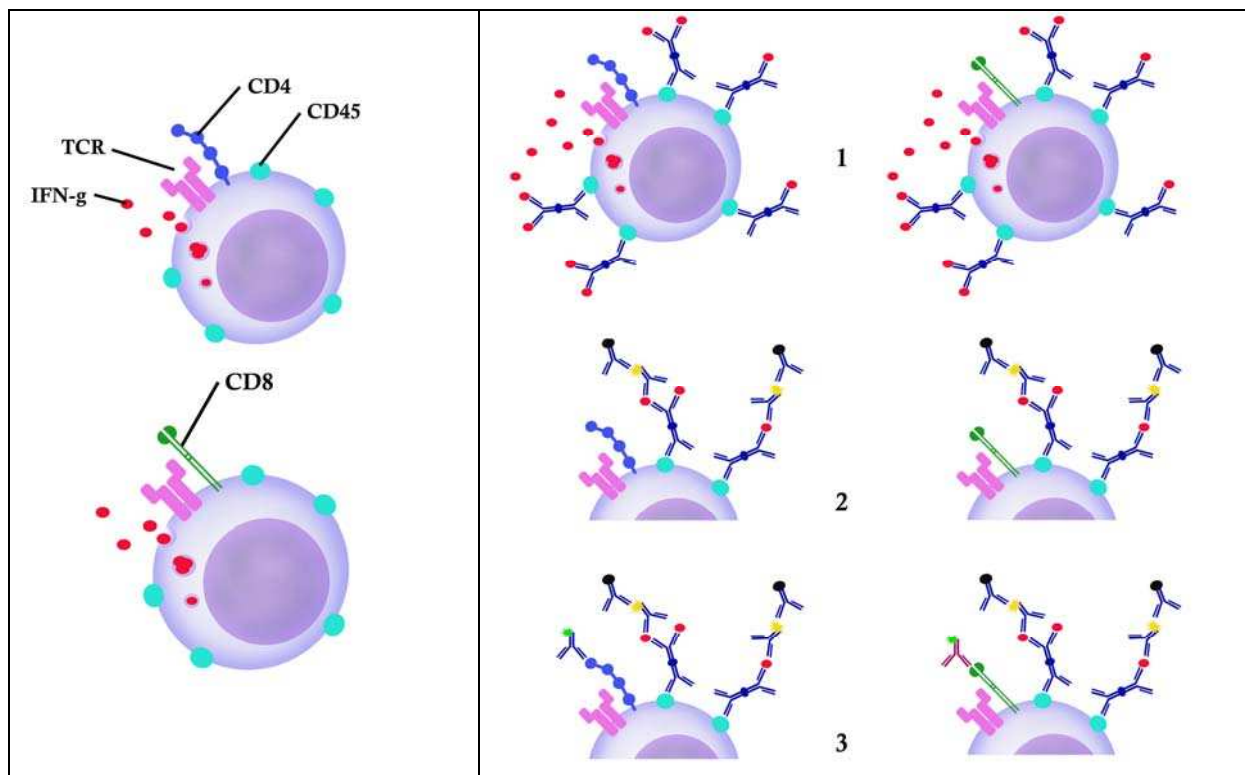


Abb. 4: Schema des Antikörper-Konstruktes auf der Oberfläche der Leukozyten; Legende der Rezeptoren links

Die Lösung der mit dem divalenten AK beschichteten Zellen wurde nun in 20 ml warmes Zellkulturmedium (RPMI+FKS+Pen/Strp) gegeben und 45 min bei 37°C bebrütet. Durch die Erhöhung der Temperatur auf einen physiologisch normalen Wert nehmen die Zellen wieder ihre Funktionen auf, unter anderem eben auch das Sezernieren von Botenstoffen. Also bilden die aktivierten T-Zellen IFN- γ und dieses bindet nun direkt wieder an die divalenten AK, mit denen die T-Zellen im vorhergehenden Schritt bedeckt worden waren. Somit können einzelne IFN- γ sezernierende Zellen später erkannt werden, sind sie doch quasi mit ihrem eigenen IFN- γ „umhüllt“. Dabei ist es jedoch wichtig, die Röhren mit den T-Zellen alle 5 min zu schwenken, um ein Absinken der Zellen zu verhindern, da diese sonst zu nahe aneinander geraten und sich gegenseitig mit IFN- γ beladen könnten, was die Aussagekraft der Messwerte beeinträchtigen würde (s. **Abb. 4:** 1).

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das Zentrifugenröhrchen mit 20 ml eiskaltem FACS-Puffer aufgefüllt und auf Eis jede weitere Sekretion von IFN- γ unterbunden. Die stimulierten Zellen wurden pelletiert (4°C, 300·g, 10 min) und in 20 ml kaltem Puffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt, um alle restlichen AK auszuwaschen.

Danach wurde die Zellsuspension in 160 μ l kaltem Medium wieder gelöst und unter Zugabe von 40 μ l mit PE (Phycoerythrin) gefärbtem *IFN- γ -detection-AK* (Miltenyi) 10 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeitspanne sind alle IFN- γ -Bindungen abgesättigt, d.h. eine weitere Sekretion von IFN- γ führt zu keiner Veränderung der Versuchsergebnisse mehr. Daher müssen ab diesem Zeitpunkt nicht mehr alle Schritte auf Eis durchgeführt werden. Nach einem weiteren Waschschrift (20 ml kalter Puffer 4°C, 300·g, 10 min) wurden alle IFN-g sezernierenden Zellen, die ja jetzt mit PE-markiert waren, mit magnetischen *Anti PE MicroBeads* (engl. „bead“ = Perle, Miltenyi, s. **Abb. 4:** 2: Antikörper mit PE: gelber Stern; *Bead*: schwarze Kugel) markiert, um sie anschließend magnetisch aufzureinigen zu können. Dazu wurden die abzentrifugierten Zellen in 160 μ l kaltem Medium unter Zugabe von 40 μ l *MicroBeads* suspendiert und 15 min bei 4-8°C inkubiert. Wichtig ist, dass dieser Schritt nicht auf Eis erfolgt, da die Bindung der Kugeln sonst nicht schnell genug wäre. Sodann wurden die Zellen in 20 ml kaltem Puffer gewaschen (4°C, 300·g, 10 min) und das Sediment in 1 ml kaltem Puffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde bis zur Aufreinigung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2. 5. 3. 2 MACS-Aufreinigung IFN- γ -sezernierender Zellen

Für die magnetische Zell-Separation wurden die benötigten Säulen (Miltenyi MS) in das Magnetfeld eines Permanentmagneten (OctaMax, Miltenyi) gestellt, mit je 500 μ l kaltem Puffer befeuchtet und der Durchfluss verworfen. Die Zellen wurden anschließend über ein Filterpapierchen (20 μ l Porengröße) in die Säulen pipettiert, um Zellklumpen, die die Messung verfälschen würden, schon vor dem Aufreinigen herauszufiltern. Die mit Kugeln beladenen Zellen bleiben nun durch das Magnetfeld in den Säulen gebunden. Der Durchfluss an nicht markierten Zellen wurde verworfen. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen mit jeweils 500 μ l eiskaltem Puffer, wobei speziell darauf zu achten ist, dass neuer Puffer immer erst nachgegeben wird, wenn das Reservoir der Säule bereits leer ist, um Verdünnungseffekte, die die Effizienz des Waschschritts gefährden würden, zu vermeiden. Nach dem dritten Waschschritt wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und in eine zweite, bereits mit Puffer befeuchtete MS-Säule gestellt. Die in der ersten Säule gebundenen Zellen wurden nun durch schnelles Durchpressen von 1 ml kaltem FACS-Puffer mit dem mitgelieferten Stößel in das Reservoir der zweiten Säule gespült. Die oben beschriebenen Waschschritte wurden auch in der zweiten Stufe der Aufreinigung noch einmal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen rasch mit dem mitgelieferten Stößel in 1000 μ l kaltem Puffer in ein 50-ml-Falcon-Zentrifugenröhrchen eluiert.

Am Ende dieses Prozesses befanden sich nun die IFN- γ sezernierenden Zellen aus $2 \cdot 10^7$ Ausgangszellen zur weiteren Färbung im Zentrifugenröhrchen.

2. 5. 3. 3 Färbung der T-Zellen nach CD4 und CD8

Die 1000 μ l Zellsuspension wurden nun in zwei Chargen zu je 500 μ l geteilt und die eine mit CD4-, die andere mit CD8-AK (Miltenyi) gegengefärbt. Dazu wurden je Zelllösung 10 μ l Anti-CD4- oder Anti-CD8-AK zugegeben, 4-8 min bei RT inkubiert und danach die Zellen erneut mit jeweils 10 ml kaltem Puffer gespült (4°C, 300·g, 10 min) (s. **Abb. 4:** 3). Das sehr kleine Sediment wurde zur Analyse im FACS-Gerät in 500 μ l kaltem FACS-Puffer (B 1.3.6) resuspendiert.

2. 5. 3. 4 FACS-Messung der IFN- γ -sezernierenden Zellen

Da tote Zellen unspezifisch AK binden können und somit die Messungen verfälschen, wurde zusätzlich zur Färbung auf IFN- γ (PE) und CD4 oder CD8 (FITC) noch eine Anfärbung toter Zellen durchgeführt. Diese erfolgte mit Propidiumiodid (PI) und erlaubte es, tote Zellen aus den Messungen auszuschließen (gaten).

PI (Invitrogen) wurde in PBS als Stammlösung (2 mg/ml) angesetzt und bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt. PI wurde in einer Arbeitskonzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt und erst kurz vor der Messung im Durchflusszytometer zugesetzt.

Analyse und graphische Darstellung der Daten erfolgten mit der FlowJo Software von Tree Star.

2. 6 Tierexperimentelle Untersuchungen

Sieben Wochen alte weibliche Balb/C-Mäuse (Harlan Winkelmann, Borcheln) wurden nach der Lieferung etwa 7 Tage unter Quarantäne gehalten, bevor sie in Versuchen eingesetzt wurden. Die Mäuse lebten unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) in einzeln mit Überdruck belüfteten Käfigen (Rereg, Waldkraiburg). Steriles Mäusezuchtfutter und steriles Trinkwasser waren für sie unbegrenzt verfügbar.

2. 6. 1 Applikation von Impfsalmonellen mittels Schlundsonde

Die gewünschten Salmonellenstämme wurden aus einer Kultur in ein hyperosmolares (300 mM NaCl)-LB-Medium angeimpft und im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,8 bis 1,0 (spätlogarithmische Wachstumsphase) hochgezogen. Anhand der fotometrisch bestimmten Dichte („optical desity“ = OD) lässt sich recht genau die Keimzahl (KBE) in einer für die Messung auf OD 0,3 bis 0,5 verdünnten Kultur anhand folgender Formel errechnen: $KBE_{(OD)}[\text{in } 100 \mu\text{l}] = (4,896 \cdot 10^7 \cdot OD) - (3,53 \cdot 10^5)$

Die Salmonellen wurden bei Erreichen einer ausreichenden Dichte abzentrifugiert, das Pellet in PBS resuspendiert und so eingestellt, dass sich in 100 µl stets $5 \cdot 10^8$ KBE befanden.

Diese Lösung wurde auf Eis gestellt und zur Verwendung in eine 1-ml-Spritze mit einer Schlundsonde (22G-Feeding Needle) aufgenommen. Um die Gabe der Infektionslösung so schonend wie möglich zu gestalten, wurde die Maus fest am Rückenfell gepackt und mit dem Bauch nach oben gedreht, ihr Kopf überstreckt und die Feeding Needle mit leichten Drehbewegungen am rechten Schlundrand der Maus entlang in den Oesophagus eingeführt. Ohne Widerstand wurden die 100 µl langsam verabreicht. Anhand von Versuchen mittels Methylenblau gefärbten Lösungen konnte gezeigt werden, dass mit dieser Technik der Mausmagen komplett durchgespült wird und sogar einiges noch ins Duodenum der Maus gelangt.

2. 6. 2 Intranasale Immunisierung

Für die intranasale Immunisierung kam die Diethylether-Narkose zum Einsatz, um die Methode möglichst standardisiert und schonend für das Versuchstier zu gestalten. Die narkotisierte Maus wurde am Rückenfell gepackt und mit dem Kopf nach oben gehalten. Sodann wurde unter der Lupenlampe jedes Nasenloch der Maus einzeln mit einer GELoader-20 µl-Pipettenspitze (Eppendorf) intubiert und es wurden jeweils 10 µl Impflösung appliziert. Die Maus wurde anschließend, bis sie vollständig erwacht war, weiterhin in der Hand gehalten, um eine versehentliche Aspiration zu verhindern.

2. 6. 3 Blutabnahme bei der Maus

Blutabnahmen an der lebenden Maus, etwa vor Versuchsbeginn zur Bestimmung des Nullwerttiters des Präimmunsersums, wurden an den Schwanzvenen durchgeführt. Dazu wurde die Maus in eine speziell dafür gefertigte Plexiglasbox verbracht, in der sie derart eingeschlossen ist, dass durch einen Schlitz am hinteren Ende lediglich der Schwanz hervorragt. In der Box wurde die Maus eine Weile unter die Wärmelampe gehalten, bis ihre Venen weit geworden waren. Sodann erfolgte die Punktion der seitlichen Schwanzvenen mit einer 26G-Nadel. Um möglichst wenig Totvolumen für das Mausblut zu erzeugen, wurde der Konnektor zuvor von der Nadel abgebrochen, sodass das Blut direkt aus der Nadel in ein Eppendorf-Zentrifugenröhrchen tropfen konnte. Nach Beendigung der Blutabnahme wurde die Einstichstelle noch für etwa 1 min mit einem Tupfer komprimiert und die Maus zurück in ihren Käfig gesetzt. Pro Versuchstier wurden so etwa 50 µl Blut gewonnen.

2. 6. 4 Vaginallavage

Um die Menge von lokal an den Schleimhäuten produzierten sekretorischen IgA Antikörpern (sIgA) bestimmen zu können, wurde bei den ausschließlich weiblichen Versuchsmäusen Vaginalsekret gewonnen. Dazu wurde die Maus mit Diethylether betäubt und in Rückenlage die Vagina der Maus mit einer Pipette mit gelber Spitze (mittlere Größe) mit 100 µl PBS gespült. Diese Probe wurde eingefroren und später mittels ELISA analysiert.

2. 6. 5 Uringewinnung

Zur Bestimmung der AK-Titer in den ableitenden Harnwegen wurde Mäuseurin gewonnen. Dazu wurde die Maus schnell am Rückenfell gepackt, sodass sie reflektorisch Urin abgab. Genügte diese Menge nicht, wurde zusätzlich durch leichte Massage am Unterbauch der Maus die Harnblase ausgedrückt. Der Urin konnte mit einer Petrischale aufgefangen und

sodann in ein Eppendorf-Zentrifugenröhrchen überführt werden. Die Menge des so gewonnenen Urins schwankte beträchtlich, und zwar zwischen 20 und 300 (!) µl je Maus.

2. 6. 6 Töten der Versuchstiere

Nach Versuchsende wurden die Mäuse gemäß Empfehlung in Tierschutzgesetz und -verordnung mit Kohlendioxid, das langsam in ihren Käfig geleitet wurde, schonend getötet. Durch diese Art des Tötens kommt es weder zu mechanischen Beschädigungen an Organen der Maus, noch zu Verfälschungen anderer Messwerte.

2. 6. 7 Haltung der Versuchstiere nach Vakzinierung

Die Versuchsmäuse wurden stets in Überdruckboxen mit Filterdeckel gehalten und jede Woche in frische Boxen mit steriler Streu umgesetzt. Für intramuskuläre und intranasale Immunisierung wurde dieses Schema weiterhin beibehalten. Nach Immunisierung mit *Salmonella*-Impfstämmen wurde jedoch zur Sicherheit anfänglich drei Tage lang jeden Morgen die Box samt Streu gewechselt. Dies verhindert eine übermäßige Reinfektion und damit Überdosierung durch Koprophagie und führte nicht zu einer erhöhten Mortalität, verglichen mit der Haltung auf Gitter während der ersten Woche.

2. 6. 8 Intraperitoneale, subcutane und intramuskuläre Injektion

Zur intraperitonealen Applikation wurde die Maus bei fixiertem Schwanz auf den Rücken gedreht, wobei der Kopf schräg nach unten gehalten wurde, damit die Bauchorgane nach oben rutschen. Eine 1-ml-Spritze wurde mit einer 26G-Kanüle 45° nach innen und 45° nach vorne, gleich schräg rechts oberhalb des Mäusegenitals, eingestochen und die Nadel danach ohne seitliche Bewegung gerade wieder herausgezogen.

Zur subcutanen Applikation wurde die Maus zunächst über dem Os sacrum rasiert. Ein ausreichendes Volumen von 50 µl wurde der am Schwanz fixierten Maus unter Beobachtung der Quaddelbildung mittels 27G-Subcutannadel auf einer 1-ml-Spritze sehr flach in die Rückenhaut injiziert. Die entstehende Quaddel wurde leicht massiert, damit keine Flüssigkeit in den Stichkanal zurück gelangte, danach die Nadel rasch gezogen.

Die intramuskuläre Verabreichung von Lösungen erfolgte ohne Narkose mit einer 27G-Nadel in den Musculus gluteus maximus der Maus. Die Injektionsstelle wurde vorher rasiert und mittels ethanolgetränktem Tupfer desinfiziert, um Spritzenabszessen vorzubeugen. Es wurden stets 50 µl appliziert, um eine versehentliche s.c. Injektion auszuschließen.

2. 6. 9 Peritonitis-Infektionsmodell

Zur Überprüfung der Schutzwirkung des Impfstoffes wurden Bakterien intraperitoneal als Belastungsinfektion in die Maus gespritzt. Wichtig ist, dass die Bakteriensuspension genau definierter Keimzahl vor der Verabreichung gut gewaschen werden (Entfernung von freiem LPS) um keinen Endotoxinschock bei der Maus auszulösen. Nach der Infektion entwickeln die Mäuse eine Peritonitis (Bauchfellentzündung), die je nach Keimzahl entweder tödlich endet oder mild verläuft und binnen weniger Tage ausheilt. Um die Tiere keiner zu großen Belastung auszusetzen, wurde der Versuch stets nach 2 Tagen beendet.

2. 6. 10 Finale Blutabnahme

Sobald nach Versuchsende die Mäuse getötet (B 2.6.6) und rasch Blut entnommen worden war wurden die Organe aseptisch entnommen. Dazu wurde mittels einer 1-ml-Spritze mit 23G-Kanüle die Bauchaorta oder die Vena cava der Maus punktiert und das Blut langsam abgesaugt. Mit dieser Technik gelang es, das benötigte Blutvolumen zu gewinnen.

2. 6. 11 Organentnahme zur Keimzahlbestimmung und Milzzellengewinnung

Wurden nach einer Belastungsinfektion oder nach Immunisierung Organe von Versuchstieren benötigt, so wurden diese, wie unter B 2.6.6 beschrieben, getötet. Danach erfolgte eine Haut-Desinfektion der Maus, indem das Fell mit Isopropanol getränkt wurde. Sodann wurde die Maus auf dem Rücken liegend mit Kanülen an den Vorder- und Hinterbeinen auf einer Styroporunterlage fixiert und die Haut am Bauch mit einer Schere ohne Verletzung des Peritoneums eröffnet. Erst nach Abpräparation der Haut wurde das Peritoneum eröffnet und links und rechts mit Nadeln fixiert. Nun erfolgte mit neuen, sterilen Instrumenten die Entnahme der benötigten Organe wie Milz, Leber, Darm oder Harnblase.

Waren die Organe für eine Keimzahlbestimmung vorgesehen, so wurden sie in vorbereitete sterile 2-ml-Zentrifugenröhrchen überführt, die bereits 0,3 % (v/v) Tween oder 0,025 % (v/v) Triton in PBS und eine Edelstahlkugel enthielten. Mit Hilfe der Edelstahlkugel ist es möglich, anschließend die Organe im Organmörser zu homogenisieren. Um die KBE pro Gewebegewicht zu bestimmen, wurden die Röhrchen vorher stets abgewogen. Vom Organhomogenisat wurden nachher Verdünnungsreihen auf MH-Platten ausplattiert.

Mussten Milzen zur T-Zellgewinnung entnommen werden, so wurden diese als ganzes Organ unter sterilen Bedingungen in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit vorgewärmtem RPMI-Zellkulturmedium gegeben und später weiterbehandelt.

2.7 Statistische Analysen

Die Daten wurden mit der Software SigmaStat® (Systat, Erkrath) mittels Mann-Whitney Rank Sum Test oder wenn möglich mit dem Student's T-Test analysiert; p-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Dargestellt sind repräsentative Daten aller Versuche, die mehrmals wiederholt wurden und vergleichbare Ergebnisse erbrachten.

ELISA-Messungen wurden stets in Triplikaten und mit allen Kontrollen im selben Experiment auf derselben Platte durchgeführt, die OD-Quotienten wie, im Ergebnisteil (C 5.) dargestellt, errechnet und auf Signifikanz untersucht (s.o.). Auch hier wurden p-Werte $< 0,05$ als signifikant angesehen. Die Verdünnungsreihen wurden mit den gleichen Proben zweimal wiederholt.

ELI-Spot Messungen wurden doppelt und mit allen Kontrollen auf derselben Platte durchgeführt. Nach automatischer Eingabe der Rohdaten wurde die Anzahl der IFN- γ sezernierenden Zellen am Computer ausgezählt, wobei alle bereits registrierten Spots mit einem Farbpunkt markiert wurden, um Doppelzählungen zu vermeiden. Die Ergebnisse wurden auch mit dem Mann-Whitney-Rank-Sum-Test mittels Sigma Stat ® ausgewertet, $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

C ERGEBNISSE

C 1. Entwicklung der Impfproteine

1.1 Virulenzfaktorenauswahl anhand von Microarray-Daten

Die durch Impfstoffe hervorgerufene Immunreaktion soll möglichst spezifisch gegen virulente Keime gerichtet sein. Daher sollen die Impftargets einerseits möglichst auf allen virulenten ExPEC-Stämmen vorhanden sein, gleichzeitig aber auf kommensalen *E. coli*-Stämmen fehlen, um diese so gut wie möglich zu schonen. In Frage kommen also hoch virulenzassoziierte Proteine und bekannte Virulenzfaktoren. Ein Impfstoff gegen Letztere kann, neben der Opsonierung der Bakterien durch Antikörperbindung an die meist membranständigen Proteine, auch noch weitere Wirkungen, wie eine Beeinträchtigung der Funktion des Virulenzfaktors, haben. Nach Durchsicht der Microarray-Daten und der Literatur kristallisierten sich sieben Targets heraus, die Siderophorrezeptoren FyuA, ChuA, IroN, IutA, IreA sowie IhaA, ein Siderophorrezeptor, der zusätzlich auch als Adhäsion fungiert, sowie das virulenzassoziierte, vermutlich sezernierte Protein Usp mit noch unbekannter Funktion (Nakano et al. 2001).

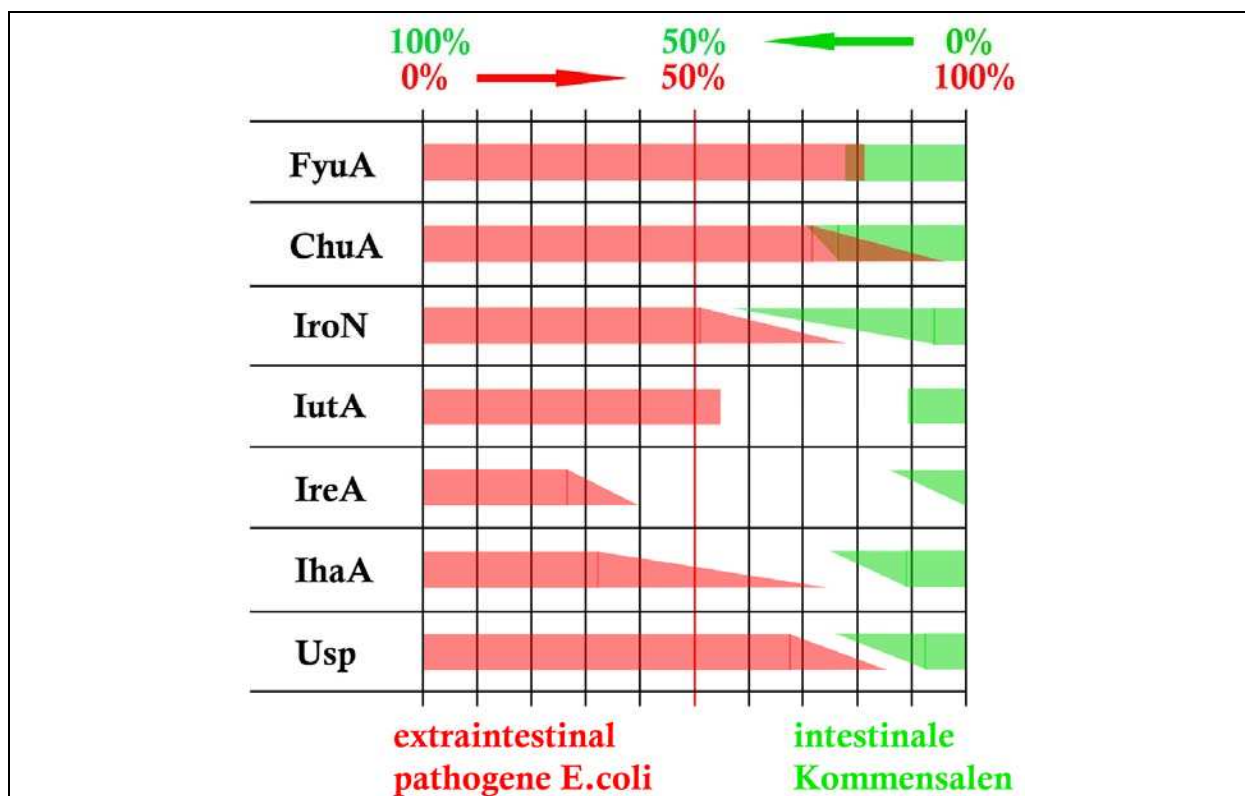


Abb. 5: Häufigkeitsverteilung der ausgewählten sieben Impftargetstrukturen: In rot von links nach rechts die Häufigkeit des jeweiligen Virulenzfaktors bei ExPEC, in grün von rechts nach links das Auftreten bei *E. coli*-Stämmen aus dem Darm von Gesunden. Die Keilform gibt dabei stets die Variationsbreite der Angaben in der Literatur wieder.

Wie **Abb. 5** verdeutlicht, sind diese Proteine hauptsächlich bei ExPEC verbreitet und bei den intestinalen Kommensalen selten. Es muss allerdings noch berücksichtigt werden, dass die hier angegebenen Daten vermutlich falsch hohe Werte bei den Kommensalen zeigen, weil der Darm auch beim Gesunden das Reservoir von ExPEC-Stämmen ist. Diese machen erst dann Symptome, wenn sie in eine andere anatomische Region, etwa den Urogenitaltrakt oder den Blutkreislauf, gelangen.

1.2 Simulation der dreidimensionalen Struktur der Proteine mit Hilfe computer-gestützter Algorithmen

Nach der Auswahl der Impftargets sollte mit computergestützten Verfahren die Struktur dieser Proteine simuliert werden, um die extrazellulären Regionen zu identifizieren, die vermutlich am ehesten mit dem Immunsystem in Wechselwirkung treten würden. Dies sind im Falle der Siderophorrezeptoren, zu denen sechs der sieben Targetproteine gehören, die extrazellulären Loops (s. **Abb. 6**).

Ferner wurden die Hydrophobizität und Sekundärstrukturzusammensetzung der einzelnen Proteine untersucht. Die Untersuchung der Ersteren war für das weitere Vorgehen besonders wichtig, ist es doch für die rekombinante Expression eines Proteins viel besser, wenn die ausgewählten Untereinheiten gut löslich sind. Des Weiteren musste im Hinblick auf die geplante Applikation der Multi-Epitop-Impfstoffproteine mit einem vom Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) abhängigen Verfahren auf eine nicht zu komplexe dreidimensionale Struktur der einzelnen Untereinheiten geachtet werden. Bei Immunisierung auf Basis des T3SS muss das Vakzinprotein durch den Nadelkomplex in das Zytoplasma einer mammalischen Zielzelle injiziert werden (s. **Abb. 3**). Der Nadelkomplex hat einen Innendurchmesser von etwa 10nm und kann von Proteinen mit komplexer Tertiärstruktur nicht durchquert werden. Dies ist einerseits direkt wichtig für die Translokation der Proteine und andererseits auch bedeutend für die Persistenz des Impfstammes im Wirt. Ein verstopftes T3SS würde die Invasion der Salmonellen in Körperzellen vermindern, da diese von translozierten Effektoren abhängig ist. Außerdem findet der Großteil der Impfstoffabgabe durch die Salmonelle statt, während sie sich in Vakuolen befindet. Ferner stellt die Invasion in Zellen einen Persistenzmechanismus dar, ohne den nur eine geringere Besiedelung möglich wäre, was wieder einen schlechteren Impferfolg zur Folge hätte.

Die Strukturprädiktion wurde, wie in B 2.2.1 beschrieben, durchgeführt und mit den beiden Proteinen FhuA (s. **Abb. 7**) und FepA, deren Struktur bereits aus Röntgenstrukturanalysen bekannt ist und die selbst auch Siderophorrezeptoren sind, überprüft.

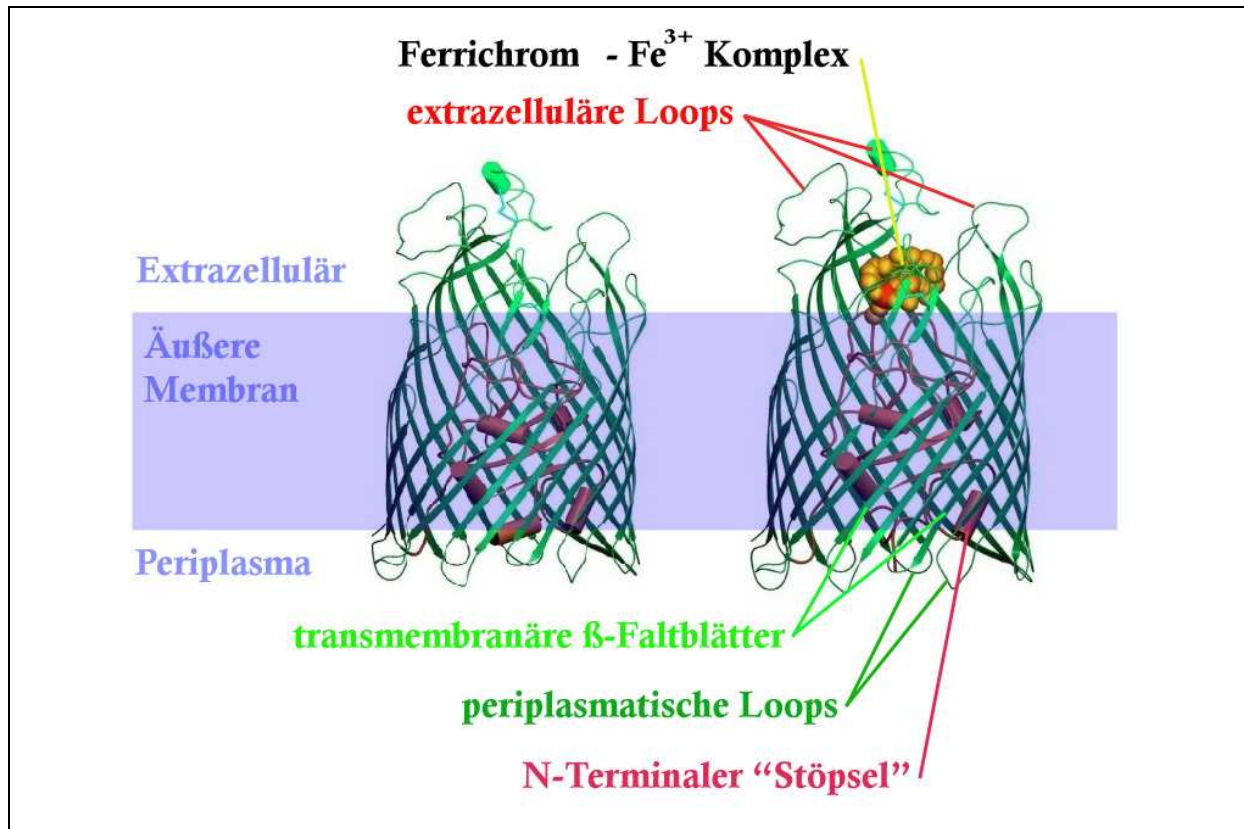


Abb. 6: Dreidimensionale Struktur des Siderophorrezeptors FhuA ohne (links) und mit (rechts) eisenbeladenem Siderophor (modifiziert nach Locher et al. 1998). N-terminaler und Ferrichrom - Fe^{3+} -Komplex

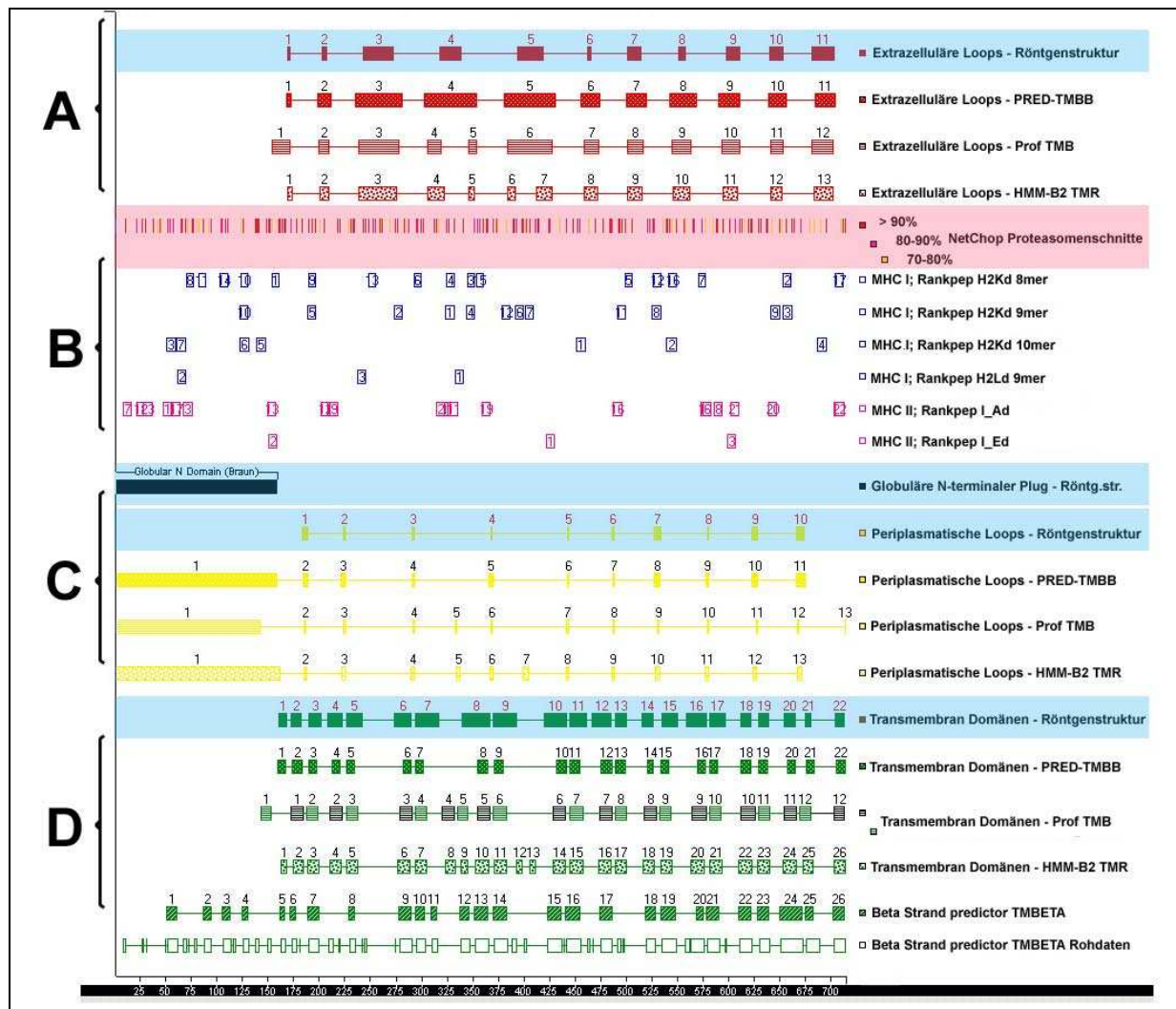


Abb. 7: Struktur- und Epitopenalyse des Siderophorrezeptors FhuA: Sequenz von links nach rechts, in blau hinterlegt jeweils die durch Röntgenstrukturanalyse bekannten Daten, in rot hinterlegt die simulierten Proteasomenschnittstellen (s. C.1.3) unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit. Im Abschnitt **A** sind die prädierten Domänen der extrazellulären, in **C** der periplasmatischen Loops dargestellt. Bei **D** befinden sich die vorhergesagten β -Faltblatt-Strukturen des Beta-Barrels. Unter **B** sind in blauer Schrift die prädierten MHC-I- und in pinkfarbener Schrift die prädierten MHC-II-Epitope, jeweils getrennt nach Allelen der Balb/C Maus, eingetragen. Weitere Analysen auf Alpha und Beta nach Garnier-Robson sowie Chou-Fasman und Eisenberg sowie der Hydrophobizitätsindex nach Kyte-Doolittle, der antigenische Index nach Jameson-Wolf und die Oberflächenwahrscheinlichkeit nach Ernini wurden ebenfalls durchgeführt, korrelieren bei Beta-Barrel-Proteinen jedoch kaum mit der Struktur. Daten dargestellt im Anhang I.

1.3 Prädestination der MHC-I- und MHC-II-Epitope sowie des Proteasomenschnittmusters, optimiert für die Balb/C-Maus in den Aminosäuresequenzen der Proteine

Für alle als Impfstoffstrukturen ausgewählten Proteine wurden unabhängig von den gewonnenen Strukturdaten computergestützt die MHC-I- und MHC-II-Epitope prädestiniert (s. **Abb. 7**). Dabei wurde (s. B 2.2.2 und 2.2.3) besonderer Wert auf eine Präsentierbarkeit, speziell auf den MHC-Rezeptoren der als Modell benutzten Balb/C-Maus, gelegt. Die Balb/C-Maus ist eine Inzucht Mauslinie die nur noch die MHC-I-Allele *Kd*, *Dd* und *Ld* sowie die MHC-II-Allele *I-Ad* und *I-Ed* besitzt. Bei den Analysen sind stets alle diese Allele in ihrer Bindungsspezifität berücksichtigt worden, in den Schaubildern sind jedoch nur die Reihen dargestellt, in denen tatsächlich ein Epitop prädestiniert wurde. (Daher ist etwa in **Abb. 7** keine Zeile für gute 9mere oder 10mere des MHC-I-Allels *Dd* vorhanden.) Es wurde auch stets das Proteasomenschnittmuster bei der Auswahl der MHC-I-Epitope berücksichtigt, da für das C-terminale Ende der auf MHC-I präsentierten Epitope die Schnittstelle des Proteasoms von großer Bedeutung ist, während die Länge des Peptids meist über ein N-terminales Trimmen im ER festgelegt wird (Del Val et al. 1991; Theobald et al. 1998; Cascio et al. 2001).

Alle über die Proteine gewonnenen Informationen wurden zusammengefasst und in Diagrammen für jedes einzelne Protein dargestellt. Anhand dieser Darstellungen (z.B. **Abb. 7** oder ausführlicher Anhang Teil **I**) wurden danach per Hand die kurzen Sequenzen der Virulenzfaktoren ausgewählt, die sowohl viele Epitope der Klassen MHC-I und -II enthielten als auch auf den extrazellulären Loops lagen. Diese zwischen 24 und 53 Aminosäuren langen Sequenzen, zwei bis drei pro Impfantigen, sollten so miteinander verbunden werden, dass zwei Multi-Epitop-Proteine entstehen. Da sich jedoch an den Schnittstellen dieser Sequenzen Epitope ergeben könnten, die auf den Virulenzfaktoren keine Entsprechung haben, da sie aus Teilen zweier verschiedener Untereinheiten bestehen, wurden Letztere mit Spacern getrennt. Diese bestehen aus der AS-Sequenz „GlyProGlyProGly“ und sind durch ihre räumliche Struktur praktisch nicht auf MHC-I- oder -II-Rezeptoren präsentierbar (Sette et al. 2002). Insgesamt ergaben sich so zwei Multi-Epitop-Proteine, Vol1 und Vol2, mit einer Länge von 343 und 342 AS. Die genaue Zusammensetzung beschreibt **Tab. 7**. Epitope, die Teile der Spacer miteinfassen (< 8% der Epitope), wurden nicht in der Tabelle mitgezählt.

| Impfstoff-Protein: | Virulenzfaktor: | Abschnitt: # | Lage im Protein [AS]: | Länge [AS]: | Epitope MHC-I: | Epitope MHC-II: |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|----------------|-------------------|--------------------|
| Vol1 | IutA | 1 | 438-472 | 35 | 3 | 2 |
| | | 2 | 493-545 | 53 | 5 | 3 |
| | IhaA | 1 | 206-233 | 28 | 4 | 1 |
| | | 2 | 593-625 | 33 | 5 | 1 |
| | FyuA | 1 | 345-383 | 39 | 6 | 2 |
| | | 2 | 496-530 | 35 | 3 | 1 |
| | Usp | 1 | 298-324 | 27 | 4 | 3 |
| | | 2 | 86-109 | 24 | 1 | 2 |
| Vol2 | IreA | 1 | 436-467 | 32 | 2 | 2 |
| | | 2 | 559-594 | 36 | 3 | 1 |
| | | 3 | 364-390 | 27 | 2 | 1 |
| | ChuA | 1 | 340-379 | 40 | 3 | 2 |
| | | 2 | 497-526 | 30 | 3 | 2 |
| | IroN | 1 | 274-306 | 33 | 4 | 1 |
| | | 2 | 480-520 | 41 | 3 | 1 |
| | | 3 | 554-587 | 34 | 2 | 2 |

Tab. 7: Zusammensetzung der Impfstoffproteine Vol1 und Vol2

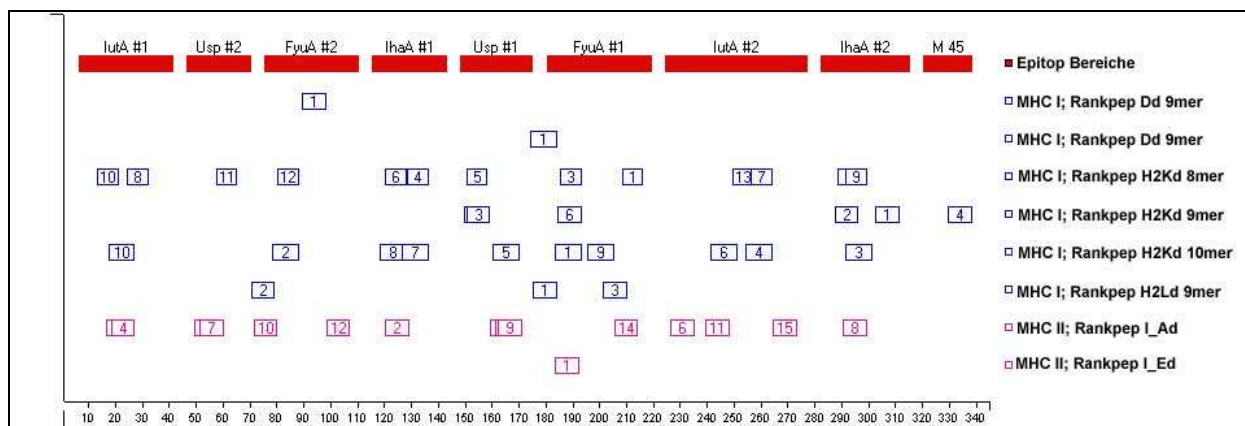


Abb. 8: Darstellung des Multi-Epitop-Proteins **Vol1** mit den einzelnen Domänen (rote Balken), benannt nach den Virulenzassoziierten Proteinen (VAP), von denen sie stammen, sowie den nach MHC-Allelen getrennt simulierten Epitopen für MHC-I (blau) und MHC-II (rosa). (C-terminaler Proteasomenschnitt bei MHC-I-Epitopen berücksichtigt, hier nicht gezeigt.) Weitere Analysen auf Alpha und Beta nach Garnier-Robson sowie Chou-Fasman und Eisenberg sowie der Hydrophobizitätsindex nach Kyte-Doolittle, der antigenische Index nach Jameson-Wolf und die Oberflächenwahrscheinlichkeit nach Ernini wurden ebenfalls durchgeführt. Daten dargestellt im Anhang I.

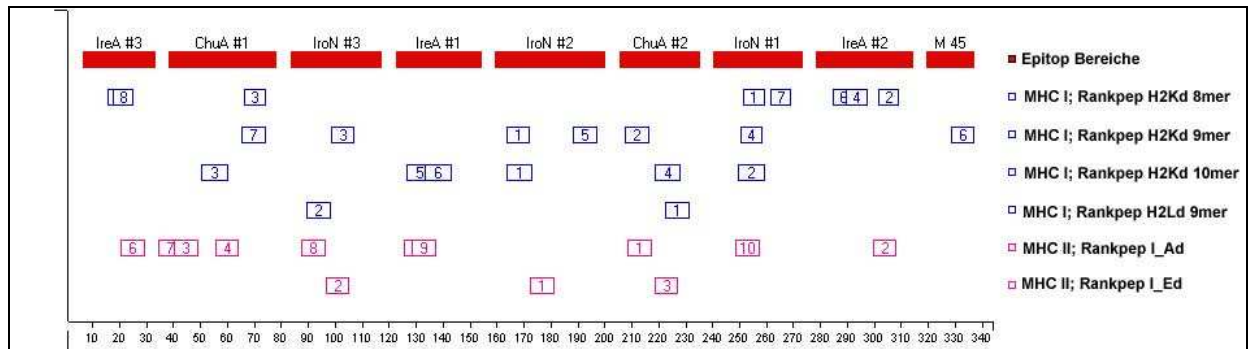


Abb. 9: Darstellung des Multi-Epitop-Proteins **Vol2** mit den einzelnen Domänen (rote Balken), benannt nach den VAP, von denen sie stammen, sowie den nach MHC-Allelen getrennt simulierten Epitopen für MHC-I (blau) und MHC-II (rosa). (C-terminaler Proteasomenschnitt bei MHC-I-Epitopen berücksichtigt, hier nicht gezeigt.) Weitere Analysen auf Alpha und Beta nach Garnier-Robson sowie Chou-Fasman und Eisenberg sowie der Hydrophobizitätsindex nach Kyte-Doolittle, der antigenische Index nach Jameson-Wolf und die Oberflächenwahrscheinlichkeit nach Ernini wurden ebenfalls durchgeführt. Daten dargestellt im Anhang I.

1.4 Ermittlung und Optimierung der synthetischen Gensequenz für die Multi-Epitop-Proteine Vol1 und Vol2

Das Protein wurde zunächst mit dem im DNASTar Lasergene-Paket mitgelieferten optimierten Codon-Bias für *Enterobacteriaceae* in DNA umgeschrieben und danach von Hand editiert, um unerwünschte Restriktionsenzymstellen zu entfernen. Ferner wurden TATA-Boxen und AT- oder GC-reiche Repeats so gut wie möglich entfernt. Eingebaut wurden am Anfang des Gens die Schnittstelle für *Bam*HI, am Ende die Schnittstellen für *Pst*I, *Kpn*I und *Sal*I. Zwischen den Schnittstellen von *Pst*I und *Kpn*I befindet sich außerdem ein Stopcodon. Die weitere Optimierung der Sequenz erfolgte bei der Firma GENEART (Regensburg) mit dem Computersystem GeneOptimizer™. Hier wurden auch interne „ribosomal entry sites“ und „chi sites“ detektiert und beseitigt. Außerdem wurden bei der Transkription entstehende komplexe mRNA-Sekundärstrukturen prädestiniert und die DNA-Sequenz dahingehend verbessert, dass das Auftreten eventuell störender Strukturen verhindert wird. Die Analyse erfolgte wie unter B 2.1.8 beschrieben mit den öffentlich zugänglichen Programmen *GeneBee* (<http://www.genebee.msu.su/genebee.html>) des Belozersky Institute, Moskau, Russland, sowie *RNAFold* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) des Instituts für theoretische Chemie der Universität Wien (Gruber et al. 2008). Es ergab sich eine optimierte Sequenz mit nur geringer Tendenz zur Haarnadelbildung und Dimerisierung (s. **Abb. 10 ff**) sowie weitgehend homologer Entropieverteilung über die gesamte Sequenzlänge.

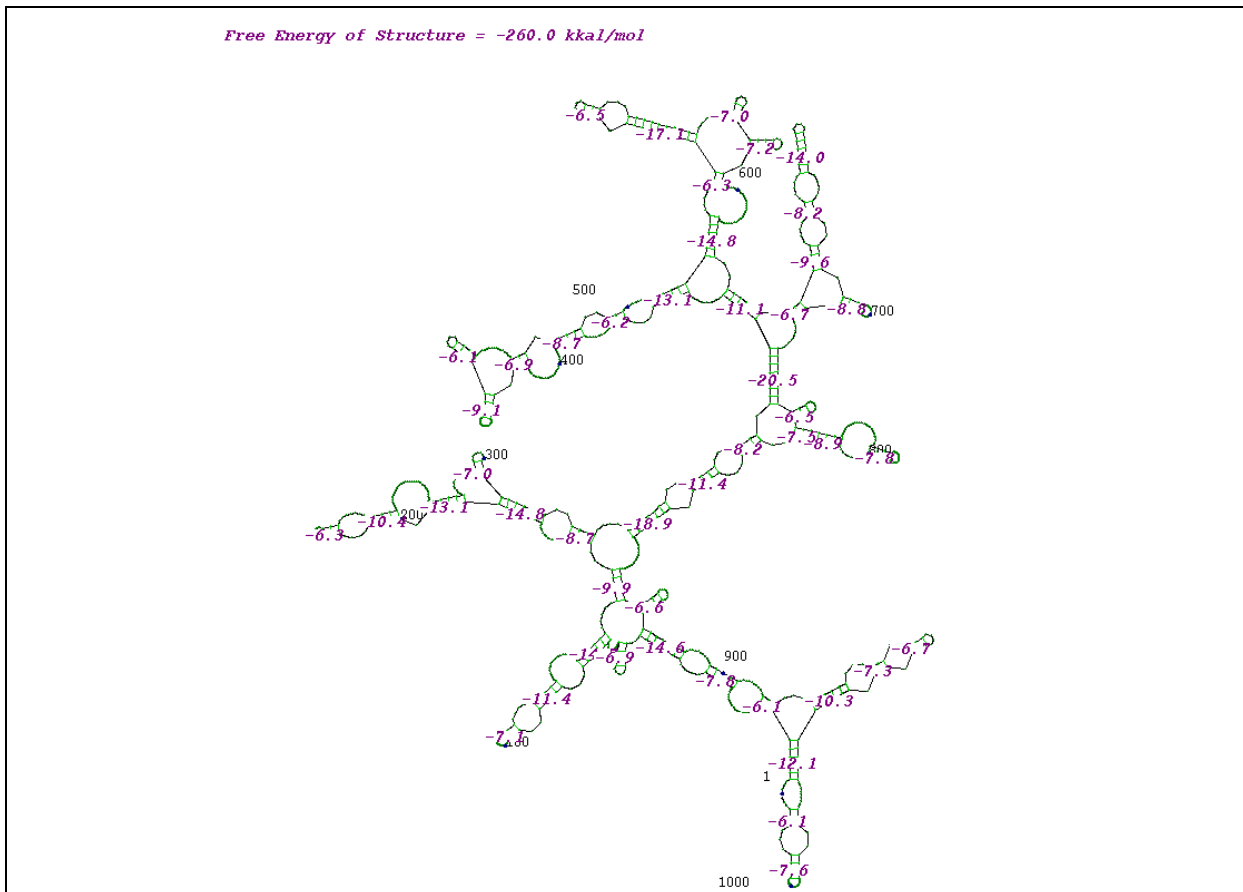


Abb. 10: Freie Struktur der optimierten Sequenz mit der geringsten freien Energie; mRNA von Voll1. (*GeneBee*)

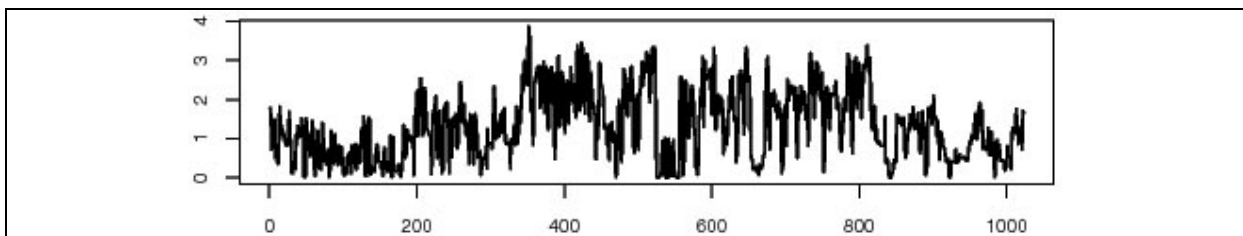


Abb. 11: Homologe Entropieverteilung von Voll1-mRNA (Entropie: Y-Achse) über die ganze Sequenzlänge (X-Achse in bp). (*RNAFold*)

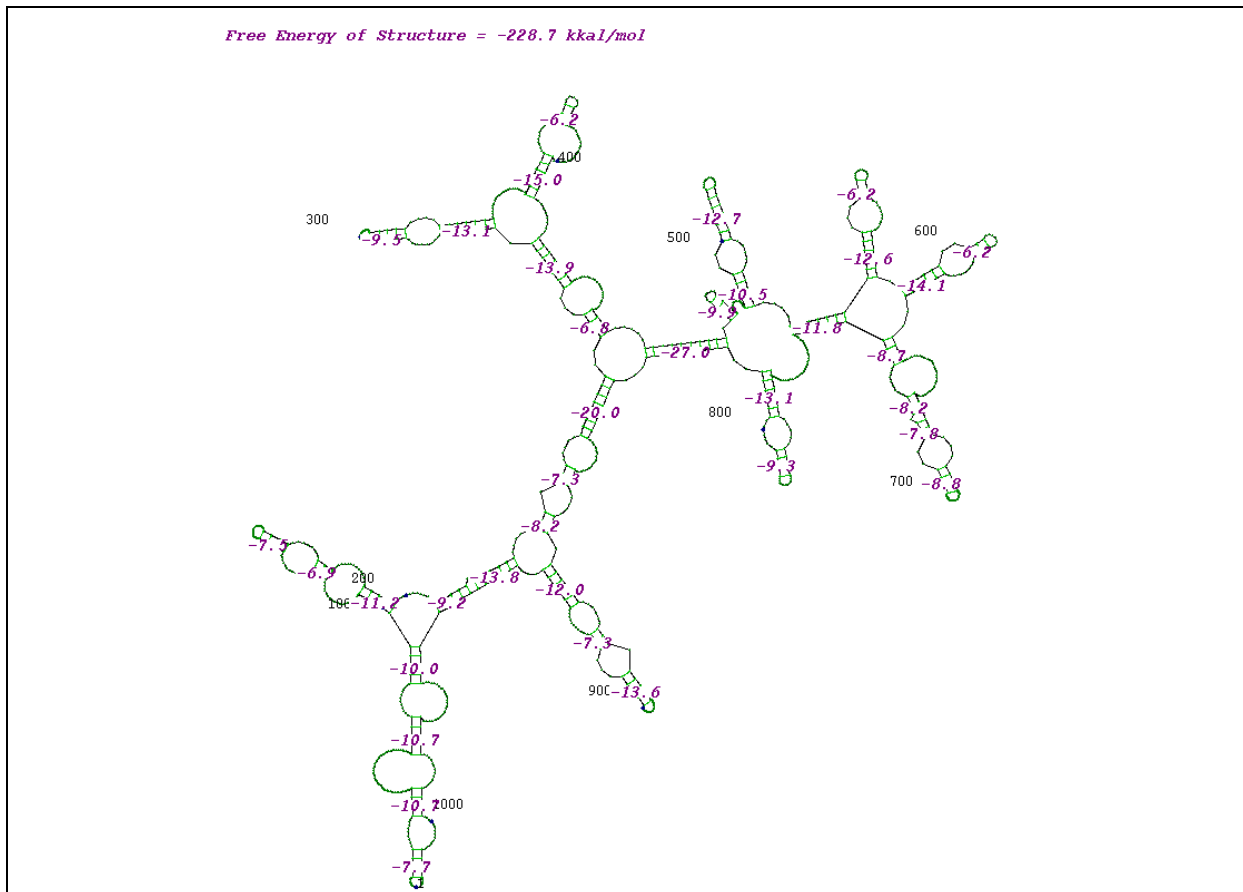


Abb. 12: Freie Struktur der optimierten Sequenz mit der geringsten freien Energie; mRNA von Vol2. (*GeneBee*)

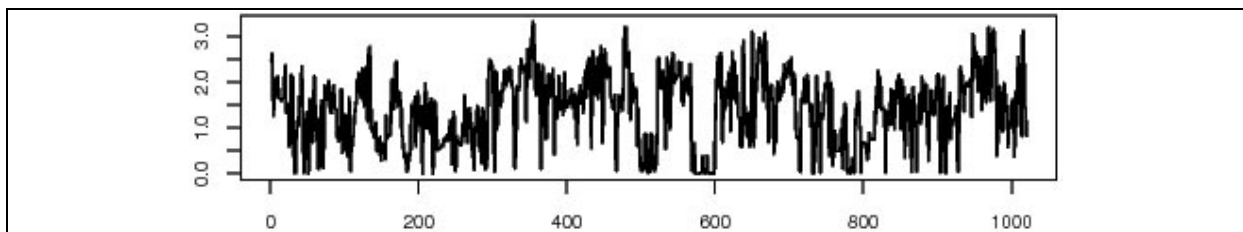


Abb. 13: Homologe Entropieverteilung von Vol2-mRNA (Entropie: Y-Achse) über die ganze Sequenzlänge (X-Achse in bp). (*RNAFold*)

Die endgültigen synthetischen Sequenzen für die zwei Gene waren, inklusive m45-Tag und Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende, 1032 und 1029 Basenpaare lang. Diese Gene wurden in der Firma BioS&T (Lachine, Kanada) noch einmal hinsichtlich der Sequenz untersucht und nach geringfügigen Veränderungen der Sequenz dort zur Synthetisierung in Auftrag gegeben. Die Auslieferung der synthetischen DNA-Produkte erfolgte im pUC57-Vektor, einkloniert über die Schnittstellen *HindIII* am 5'-Ende und *EcoRI* am 3'-Ende. Genaue Sequenz und Aufschlüsselung des Codon-Usage sowie der Basenverteilung des entsprechenden Gens für Vol1 und Vol2 finden sich im Anhang II und III.

C 2. Proteineexpression im bakteriellen System

Zur Herstellung größerer Mengen an synthetischem Impfstoffprotein erfolgte dessen Expression zytoplasmatisch in Bakterien. Dazu wurden die synthetischen Gene, die im pUC57- Vektor vorlagen, in die Expressionsvektoren pQE30 über *Bam*HI, *Sal*I und in pASK-IBA37+ über *Bam*HI, *Kpn*I einkloniert. So ergab sich ein Genprodukt folgenden schematischen Aufbaus, dessen Sequenz durch Sequenzierung bestätigt wurde (s. **Abb. 14**).

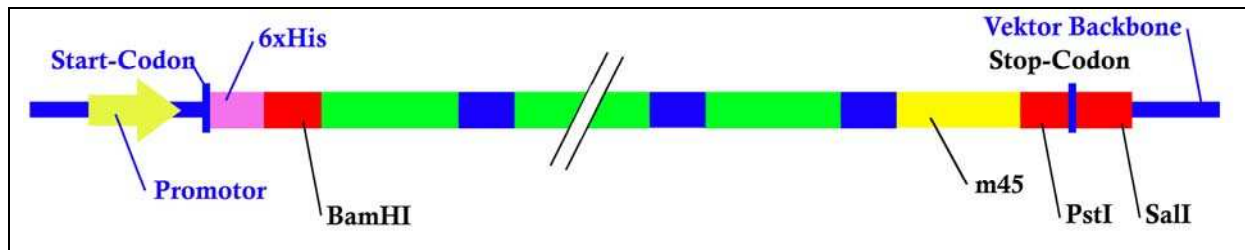


Abb. 14: Klonierung des rekombinanten Gens mit *Bam*HI und *Sal*I in den Expressionsvektor pQE-30 mit induzierbarem Promotor und 6 Histidin Codons die für das His tag zur Aufreinigung codieren.

Beide synthetischen Impfstoffproteine wurden zuerst in kleinem Maßstab exprimiert und erwiesen sich in beiden Vektoren als exzellent induzierbar (s. **Abb. 16**). In der Folge wurde einheitlich mit den pQE-30-Vol1- und -Vol2-Konstrukten weitergearbeitet, da sie N-terminal zwischen dem 6xHis und der *Bam*HI-Schnittstelle eine kürzere Übergangssequenz aufweisen. Dadurch sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass in der später mit dem betreffenden Protein immunisierten Maus eine ungewollte Immunreaktion gegen diesen Bereich auftritt.

Ferner wurde, um als Kontrolle eventuelle Reaktionen der Maus gegen die N- und C-terminalen Tags ausschließen zu können, in einem anderweitig konstruierten Vektor auf Basis des pQE-Promotorsystems ein Fusionsprotein aus der N-terminalen Tag-Sequenz, der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) der Maus und dem m45-Epitop konstruiert (s. **Abb. 15**). Dieses Protein trägt also N- und C-terminal die gleiche Sequenz wie sie die Impfstoffproteine tragen, dazwischen jedoch befindet sich das nur sehr wenig immunogene, weil mauseigene Protein DHFR.



Abb. 15: Schema des Expressionsplasmids mit 6 N-terminalem Histidin Codons und 18 C-terminalem m45-Codons an der codierenden Sequenz für die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) der Maus.

Um herauszufinden, ob die Aufreinigung mittels 6xHis-Tag möglich ist, wurde von allen induzierten Kulturen ein Zellaufschluss mit Aufreinigung durch Mini-Ni-NTA- Säulen (s. B 2.2.7) unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (s. **Abb. 17**, für His-DHFR-m45 hier nicht dargestellt).

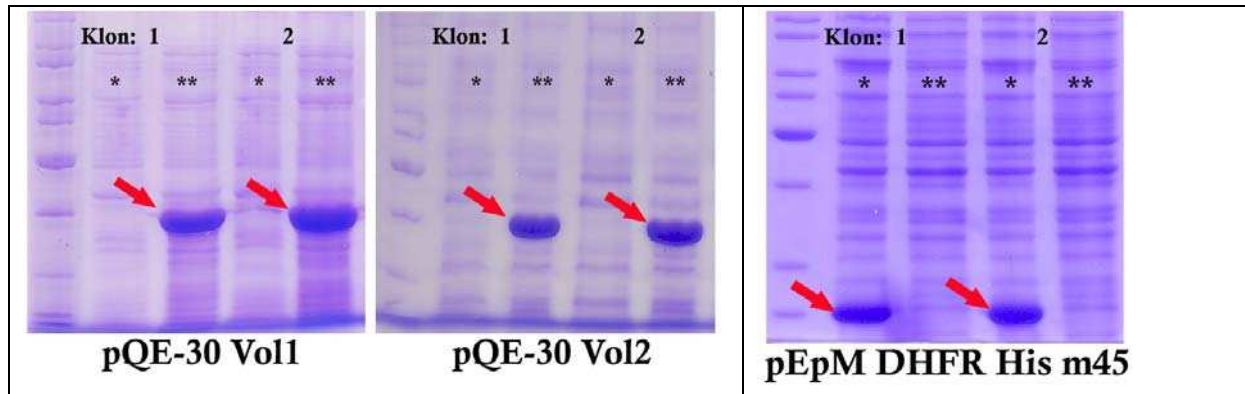


Abb. 16: SDS-Gele der Klone 1 und 2, jeweils 20 µl Bakterienkultur in Laemmli-Puffer aufgeköcht und mit Coomassie-Blau gefärbt. (*): nicht induzierte Kontrolle, (**): induziert; **Roter Pfeil:** Rekombinantes Protein, Größe: Vol1 und Vol2 je 36,9 kDa; His-DHFR-m45: 25,3 kDa

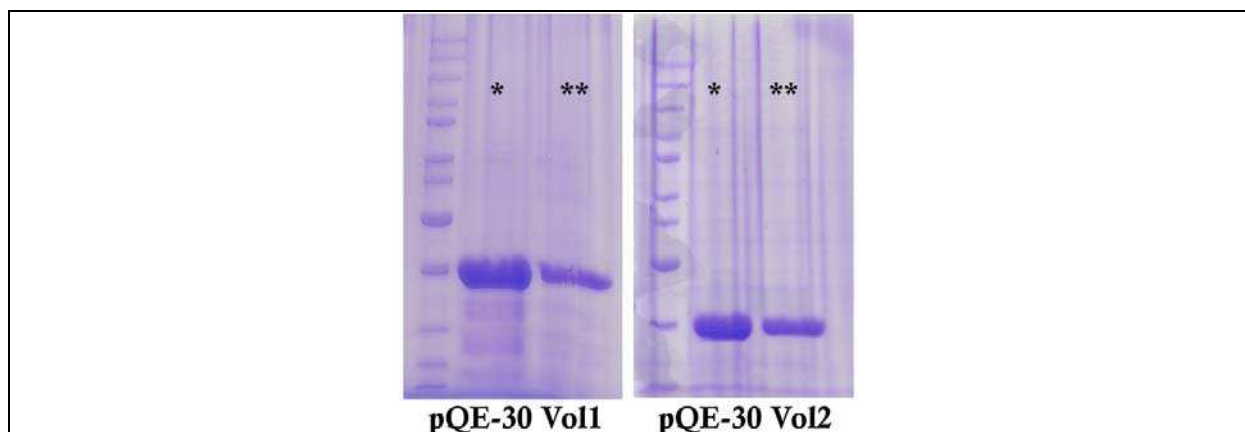


Abb. 17: Mit Coomassie-Blau gefärbte SDS-Gele der unter denaturierenden Bedingungen mit 5 M Urea gewonnenen Eluate 1 (*) und 2 (**) aus den Ni-NTA-Säulen. (Auftrag von je 5 µl aus 1 ml Eluat)

Obwohl die DNA-Sequenz der Konstrukte durch Sequenzierung bereits verifiziert worden war, wurde als weitere Bestätigung ein Teil der aufgereinigten Proteinbande aus dem Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und dem Zentrallabor für Proteinanalytik der LMU (ZfP) zur Überprüfung mittels MALDI-TOF Analysen überlassen. Die resultierenden Trypsin Fragmente stimmten sehr gut mit den anhand der Proteinsequenz erwarteten überein und bestätigten noch einmal, dass es sich bei dem überexprimierten Protein tatsächlich auch um das gewünschte Produkt handelt.

Um außerdem die Funktionalität des m45-Tags am C-Terminus des Proteins zu überprüfen, wurden Western-Blots (s. B 2.2.6) durchgeführt.

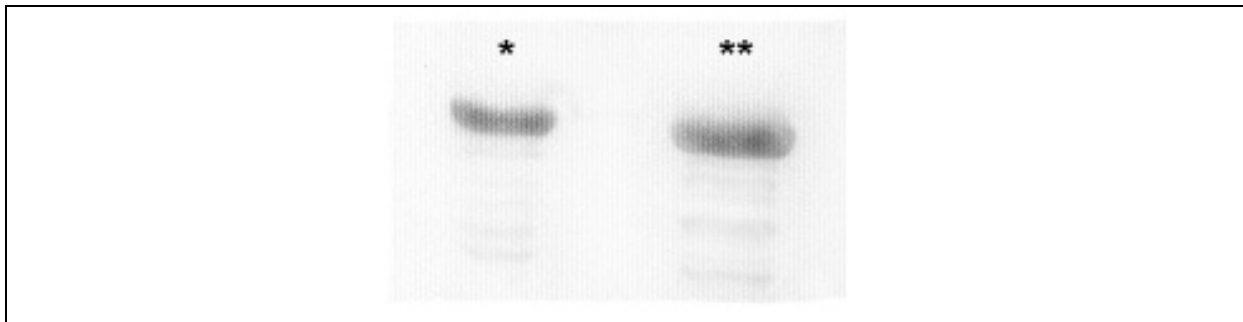


Abb. 18: Rekombinant exprimierte Proteine Vol1 (*) und -2 (**) gegen m45-AK geblottet. m45-Hybridoma-Zellkulturüberstand 1:500 verdünnt als Erst-AK, zum Nachweis Anti-Maus-IgG-HRPO-Konjugat.

Um größere Mengen an Impfstoffproteinen zu gewinnen, wurden 5L-Fermenterkulturen für Vol1, Vol2 und das Kontrollprotein His-DHFR-m45 induziert und die Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Danach erfolgte für jede Probe eine weitere Gelfiltrations-chromatographische Reinigung.

C 3. Proteinexpression und Translokation mittels Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) von *Salmonella enterica* S. Typhimurium

In der vorliegenden Arbeit sollte zur Evaluation der Immunantwort und Schutzwirkung beim Vergleich verschiedener Impfverfahren auch eine durch das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) vermittelte Vakzinierung erprobt werden. Mittels PCR-Screening wurde ausgeschlossen, dass der Impfstamm SB824 jene Virulenzfaktoren trägt, die benutzt wurden, um das Multi-Epitop-Vakzin zusammenzustellen. Somit ist der Impfstamm SB824 selbst nicht in der Lage, eine zielgerichtete Immunantwort gegen diese Faktoren auszulösen.

Abb. 19 und **Tab. 8** geben einen Überblick über das Screening. Als Positivkontrolle fungierte der ExPEC CFT073, der alle benutzten Virulenzfaktoren trägt, als Negativkontrolle diente A_{dest} . Als Template wurden gekochte Zellen benutzt. Es kamen die angegebenen Primerpaare zum Einsatz.

Die Spuren links auf dem Gel zeigen die PCR für die vier VAPs, aus denen immunogene Abschnitte für das Impfstoffprotein Vol1 ausgewählt wurden. Auf der rechten Seite sind analog die Spuren der für Vol2 benutzten Virulenzfaktoren. Im Gen für FyuA befindet sich beim als Positivkontrolle benutzten *E. coli*-Stamm CFT073 eine kleine Deletion, die aber für

die Screening-PCR weder die Primerbindung noch die Fragmentlänge nennenswert beeinflusst.

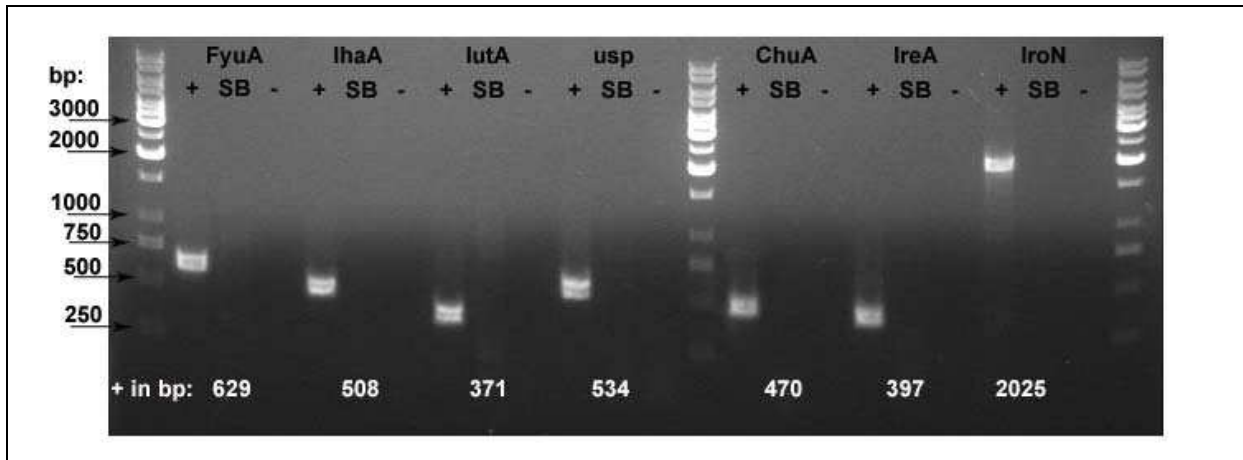


Abb. 19: Agarose-Gel der Screening-PCR; Positivkontrolle (Spur +): CFT073, gekochte Bakterienzellen; Negativkontrolle (Spur -): A_{dest}; als Template für die Messung: SB-824, gekochte Bakterienzellen.

| Virulenzfaktor: *: Voll1, **: Vol2 | Primer: | Annealing Temperatur: | Fragmentlänge bp: |
|---------------------------------------|------------------|-----------------------|-------------------|
| FyuA* | FyuA.1080.for | 58°C | 629 |
| | FyuA.1709.rev | | |
| IhaA* | Iha-irgA-262.for | 60°C | 508 |
| | Iha-irgA-770.rev | | |
| IutA* | IutA-324.for | 58°C | 371 |
| | IutA-695.rev | | |
| uspA* | Usp-285.for | 56°C | 534 |
| | 819.rev | | |
| ChuA** | ChuA.16.for | 54°C | 470 |
| | ChuA2.rev | | |
| IreA** | ireA-102.for | 56°C | 397 |
| | ireA-499.rev | | |
| IroN** | iroN.28.for | 58°C | 2025 |
| | iroN2053.rev | | |

Tab. 8: Screening Primer Paare

Um Plasmide für ein vom T3SS sezerniertes Impfstoff-Protein zu erzeugen, wurden die synthetischen Gene Voll1 und Vol2 aus den pUC57-Vektoren ausgeschnitten und statt des p60-Fragments über die Schnittstellen *Bam*HI, *Sal*I in pHR350- und pHR349-Vektoren (Domènech et al. 2005) eingebaut. So ergaben sich die Vektoren pST1 und -2 (aus pHR350) sowie pSS1 und -2 (aus pHR349). Alle hier benutzten Vektoren für *Salmonella* waren aus dem pWSK29-Plasmid (Wang and Kushner 1991) erzeugt worden und tragen neben SycE, dem YopE-spezifischen Chaperon, das zum Export von YopE durch das Yersinia-T3SS

notwendig ist, auch den in *Salmonella* Typhimurium konstitutiv aktiven Lac-Promotor. In den pST-(Plasmid-*Salmonella*-Translokations)-Vektoren werden die Impfstoffproteine als Fusionsproteine, mit den N-terminalen 138 AS des YopE, produziert. Dies führt zusammen mit SycE zur Translokation des Fusionsproteins mittels T3SS. In den pSS-(Plasmid-*Salmonella*-Sekretions)-Vektoren ist dagegen der YopE-Anteil am Fusionsprotein auf 18 AS verkürzt, sodass diese Proteine hauptsächlich durch das T3SS sezerniert werden. Die Klonierung der Plasmide fand im *E. coli*-Stamm Top10 statt. Erst das fertige und in der Sequenz mittels PCR und Sequenzierung überprüfte Plasmid wurde in den als Impfträger benutzten *Salmonella*-Stamm SB824 (Rüssmann et al. 1998) transformiert. Dieser Impfstamm ist eine *sptP*- und *aroA*-Doppelmutante. Durch eine Mutation im *aroA*-Gen (5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase) ist beim Bakterium die Synthese von aromatischen Aminosäuren gestört. Dies attenuiert den Stamm, sodass er im Allgemeinen in der Maus keine tödliche Infektion mehr auslöst. SptP ist ein über das T3SS transloziertes Protein, das Rho-GTPasen der Wirtszelle inaktiviert und damit die bei der Aufnahme der *Salmonelle* ausgelösten Veränderungen des Zytoskeletts wieder rückgängig macht (Humphreys et al. 2009). Durch die Mutation im Gen sollte in der Maus eine verstärkte Ausbildung von intrazellulären Kolonien von *Salmonellen* erreicht werden. Dies würde eine vermehrte Translokation von Effektoren und damit auch Vakzinproteinen ins Zytoplasma der Wirtszelle bewirken. Dieser Effekt konnte jedoch nie belegt werden (Rüssmann, persönl. Mitteilg.).

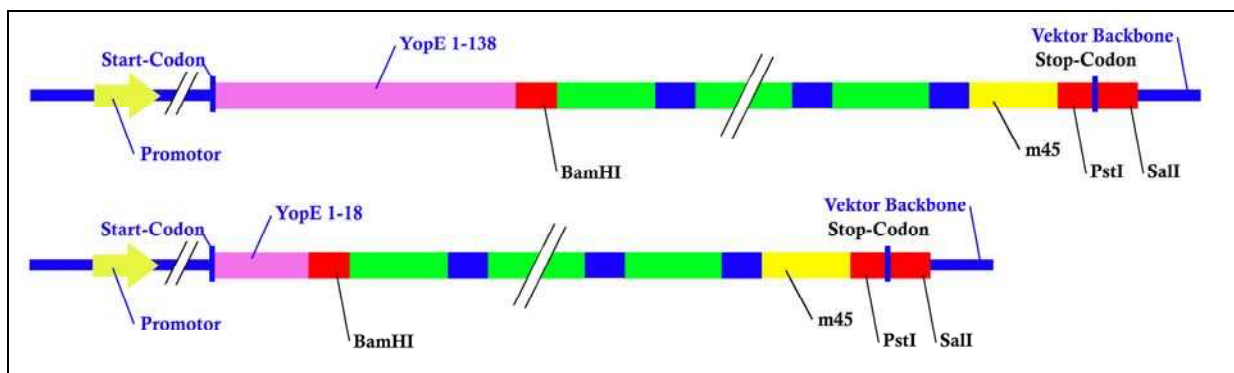


Abb. 20: Klonierungsschema der rekombinanten Impfstoffproteine in den Translokationsvektor pST mit den ersten 138 YopE Codons sowie in den Sekretionsvektor pSS mit den ersten 18 YopE codons (zum Vektorbackbone gehörende Anteile in blauer Schrift).

Die neu konstruierten Impfstämme SB824 pST1 und SB824 pST2 sowie die Kontrollstämme SB824 pSS1, SB824 pSS2 und SB824 ohne Plasmid wurden für alle Translokations- und Invasionsversuche nach einer Ü.N.-Vorkultur in hyperosmolares LB-Medium (s. B 1.13.2)

überimpft, um das SPI1-codierte Typ-III-Sekretionssystem zu induzieren. Damit sollen die Bakterien bei den Infektionsversuchen schneller befähigt sein, ihr T3SS einzusetzen und in Zellen einzudringen (Hautefort et al. 2008). Die Kulturen wurden unter OD_{600} Kontrolle bei 37°C unter Schütteln inkubiert und die Bakterienzahl wie in B 2.4.1 beschrieben, bestimmt.

Um die Funktionsfähigkeit des T3SS mit seinem Hybridssubstrat, den YopE-Impfstoff-Fusionsproteinen, nachzuweisen, wurden drei verschiedene Tests durchgeführt: Zuerst ein Invasions-Assay. Dieser basiert darauf, dass Salmonellen mittels ihrer über das T3SS translozierten Effektoren eine lokale Veränderung im Cytoskelett der Wirtszelle hervorrufen, die dazu führt, dass die Salmonellen aufgenommen wird („Membrane-Ruffling“). Würde sich schon hier eine verringerte Invasionsfähigkeit der Impfstoff produzierenden Stämme im Vergleich zu den Kontrollen ohne Plasmid zeigen, so wäre von einer generellen Störung der Sekretion durch das neu hinzugekommene YopE-Fusionsprotein auszugehen. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass das Protein eine Konformation ausbildet, die nicht transportfähig für das T3SS ist. Möglich wäre auch, dass die Impfstoffproteine das System auf andere Weise behindern (z.B. Verstopfung der T3SS Nadel).

Die Zellkulturen (Bl6-F10-Melanomzellen und HCV29-Urothelzellen) wurden mit einer standardisierten Dosis von $2,2 \cdot 10^7$ KBE je Napf einer 6-Napf-Platte mit den verschiedenen Salmonellenstämmen beimpft (Multiplicity of Infection (MOI) = 20). Nach einer Infektionszeit von 1 h wurden mit einer Gentamicinlösung (100 µg/ml) die extrazellulär verbliebenen Bakterien abgetötet. Alle bereits in die Zellen eingedrungenen Bakterien werden dabei jedoch nicht erreicht, da Gentamicin nicht in der Lage ist, die Zellmembran zu durchdringen. Die Zellkulturzellen wurden lysiert und die in den Zellen befindlichen noch lebenden, vor der Wirkung des Genatmicins geschützten Bakterien in Verdünnungsreihen ausplattiert (s. B 2.3.5).

| Zellkultur: | Stamm [<i>Salmonella</i>]: | Invasion [in % der eingesetzten KBE]: |
|-------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Bl6-F10 | SB824 | 14,2 % |
| | pST1 | 11,2 % |
| | pST2 | 12,3 % |
| HCV29 | SB824 | 10,6 % |
| | pST1 | 15,1 % |
| | pST2 | 13,1 % |

Tab. 9: Invasion in Prozent der eingesetzten Dosis des SB824-Salmonellen Stammes - ein Vergleich zwischen Zelllinien und Bakterienstämmen.

Es zeigte sich kein nennenswerter Unterschied der Invasivität zwischen den Stämmen (**Tab. 9**). Also konnte davon ausgegangen werden, dass die Funktion des T3SS durch das Vorhandensein der Plasmide pST1 oder pST2 nicht signifikant beeinflusst wird. Dies lässt jedoch noch keinen Rückschluss darauf zu, ob das Impfstoffprotein überhaupt gebildet und dann auch noch in die Zellen injiziert wird.

Um die Produktion nachzuweisen, wurden Salmonellenkulturen mit den Plasmiden pSS1, pSS2, pST1 und pST2 unter SPI-1-Induktionsbedingungen, also in hyperosmolarem-LB (300 mM NaCl, s. B.1.13.2), angezüchtet und abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde ebenso wie der steril filtrierte, mit TCA ausgefällte Überstand (s. B 2.2.8) zum Antigennachweis mittels Mab-m45 im Immunoblot verwendet. Es zeigten sich sowohl im Bakterienlysat als auch im Überstand der Kultur intensiv Mab-m45 anfärbbare Banden der erwarteten Größen von 54 oder 41 kDa (s. **Abb. 21**). Dies beweist einerseits die Produktion des Impfstoffproteins und legt andererseits durch das massive Vorhandensein im steril filtrierten Überstand eine Sekretion durch den Nadelkomplex nahe. Schließlich erscheint es unwahrscheinlich, dass so viel Impfstoffprotein alleine durch autolytische Bakterien in den Überstand gelangen konnte, da der Kulturüberstand im SDS Gel nur die Salmonellen typischen Banden sezernierter Proteine zeigt.

Es fiel jedoch auf, dass im ausgefällten Überstand der Kultur von SB824 mit Plasmid pSS2 stets noch ein kleineres Protein mit etwa 35-37 kDa nachgewiesen werden konnte (s. **Abb. 21**, roter Kreis), das nicht im geblotteten Sediment und auch nicht in den pST1- oder -2-Spuren zu beobachten war. Vermutlich handelt es sich dabei um ein Spalt- oder Zerfallsprodukt, das dadurch entstand, dass das sezernierte Protein durch Einflüsse im Überstand an der Fusionsstelle zwischen kurzem YopE (1-18) und Vol2 zertrennt wurde. Dafür würde auch die Größe von 35-37 kDa sprechen, die recht genau dem trunkierten Vol2-Impfstoffprotein mit 36,9 kDa entspricht. Da sich das m45-Tag C-terminal befindet, kann man das kleinere YopE-Spaltprodukt auf dem Blot nicht sehen. Weil dieser Zerfall bei den für die Vakzinierung eingesetzten 54-kDa-großen YopE-Fusionsproteinen nicht auftrat, wurde dieser Effekt für das weitere Vorgehen vernachlässigt.

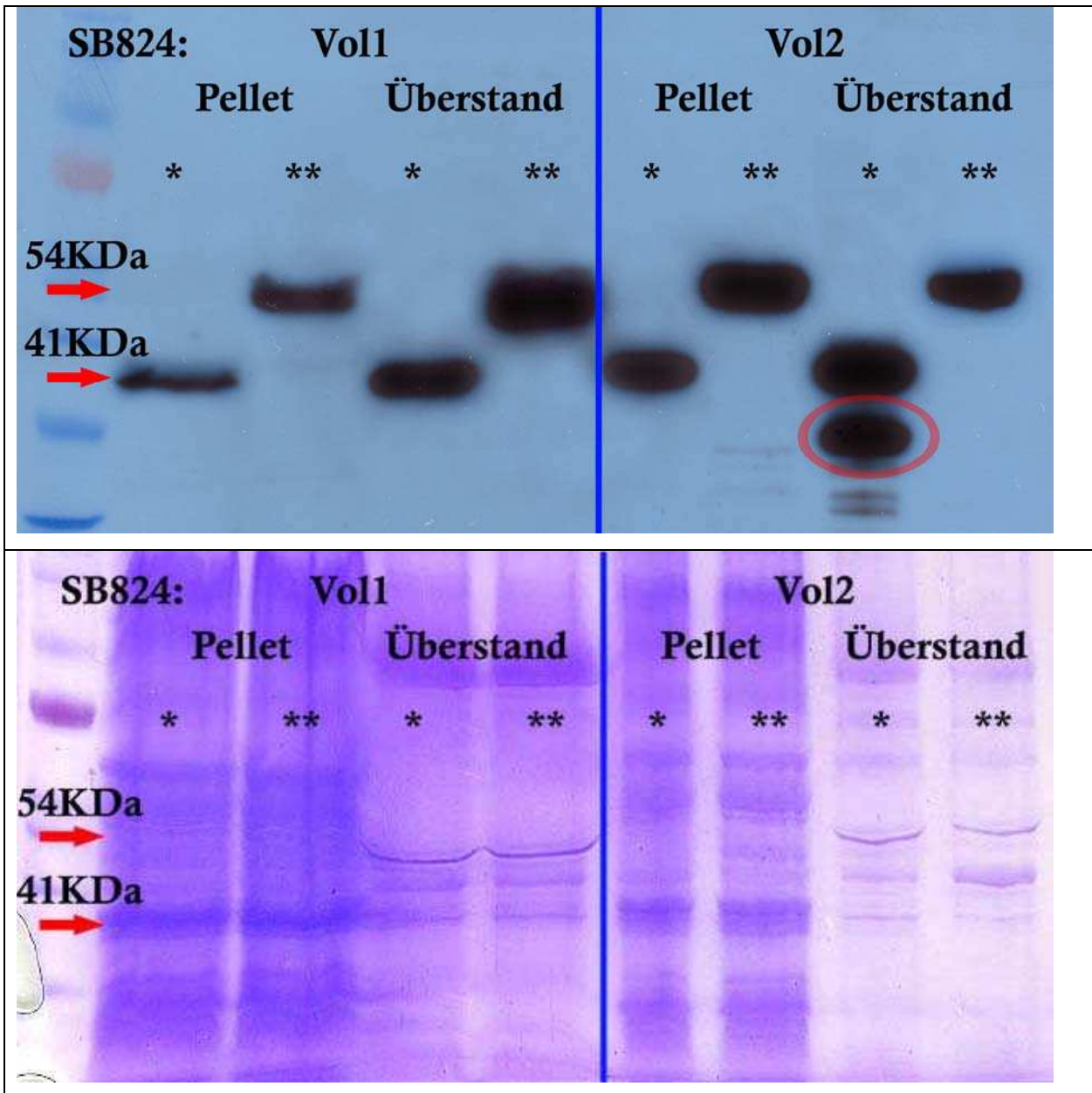


Abb. 21: Mab-m45 Immunoblot (oben) und SDS Gel (unten) von Sediment und Kulturüberstand der SB824 *Salmonella* Typhimurium mit verschiedenen Plasmiden.

*: pSS1 oder -2, Plasmid, das den Impfstoff hauptsächlich sezerniert, weil es die kurze YopE- Leadersequenz trägt (MW = 14,78 kDa);

** : pST1 oder -2, Plasmid, das durch eine lange YopE-Sequenz hauptsächlich transloziert wird (MW = 54 kDa);

Roter Kreis: zusätzliche kleinere Bande im Überstand der Kultur von SB824 pSS2.

Um auch die Translokation der Impfstoffproteine mittels T3SS ins Zytoplasma von mammalischen Zellen nachzuweisen, wurden fluoreszenzmikroskopische Bilder von infizierten HCV29-Urothelzellen angefertigt. Dazu wurden HCV29-Zellen auf Deckgläschen angezüchtet (s. B 2.3.6 und 2.3.7), mit 80 µl Salmonellenkultur der OD₆₀₀ von 0,8 (das entspricht etwa $3 \cdot 10^7$ KBE) je Napf einer 24-Napf-Platte (MOI = 300) für 20 min infiziert und anschließend gewaschen und fixiert. Die Färbung erfolgte mit Mab-m45 und Kaninchen-Anti-

Salmonella-O4. Als Sekundär-AK kamen FITC gekoppelte Anti-Maus-AK (Mab-m45) und TRITC gekoppelte Anti-Kaninchen-AK (für O4 Serum) zum Einsatz. Erstere färben die m45-markierten Impfstoffproteine grün, Letztere die Salmonellen rot an. Außerdem wurden die Zellkerne mit DAPI in Blau dargestellt.

Auf **Abb. 22** ist zu erkennen, wie die SB824-Salmonellen mit den Plasmiden pST1 und pST2 ein m45-markiertes Protein, also das jeweilige Impfstoffprotein, in großer Menge in das Zytoplasma translozieren, wohingegen bei der Kontrolle, dem Impfstamm SB824 ohne Plasmid, keine mit m45 markierten Proteine zu sehen sind. Die Aufnahmen erfolgten mit passenden Filtern und den in **Tab. 10** angegebenen Belichtungszeiten.

| Farbstoff: | Wellenlänge Absorption [nm]: | Wellenlänge Emission [nm]: | Konstante Belichtungszeit [ms]: |
|------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| DAPI | 358 | 461 | 50 |
| FITC | 492 | 520 | 600 |
| TRITC | 550 | 570 | 600 |

Tab. 10: Wellenlängen der Absorptions- und Emissionsmaxima der benutzten Farbstoffe sowie bei den Bildern von **Abb. 22** benutzte Belichtungszeiten.

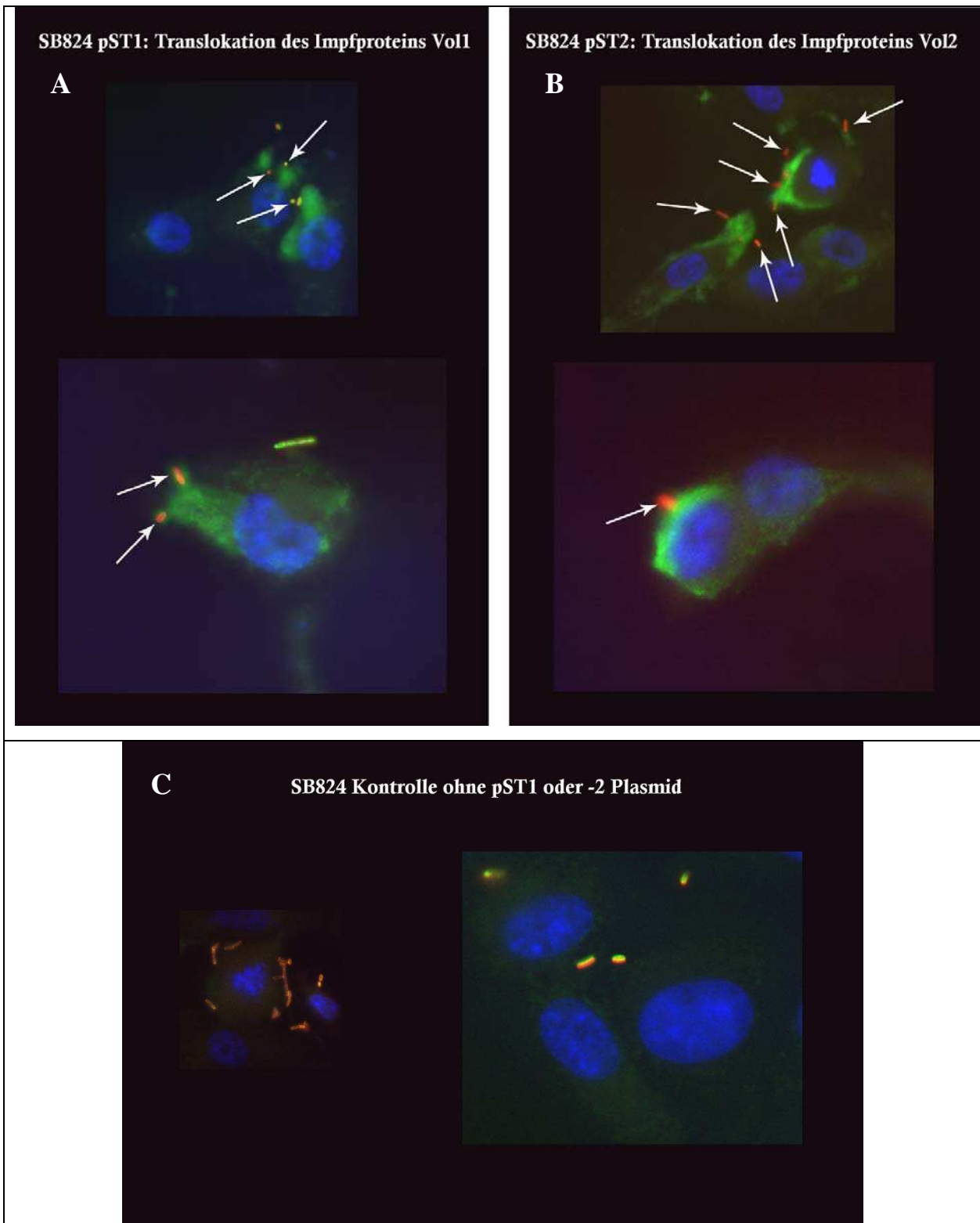


Abb. 22: Rot: Kaninchen-Anti-*Salmonella*-O4-Ak und Anti-Kaninchen-IgG- TRITC
 Grün: Anti-m45-Ak und Anti-Maus-IgG-FITC; Blau: DAPI;
 Weiße Pfeile zeigen *Salmonella* Typhimurium, die über ihr T3SS Vol1 (A) oder -2 (B) in HCV29-Urothelzellen injizieren. Salmonellen ohne m45 Hybrid-protein (C)

C 4. Vakzinierung im Mausmodell

Bei allen durchgeführten Mausversuchen wurde, um eine Kontrolle über die spezifischen Antikörpertiter zu Beginn des Versuchs zu haben, am Tag -1, also vor der Immunisierung, Blut aus der Schwanzvene entnommen, eine Vaginallavage durchgeführt sowie Urin asserviert (s. B 2.6.3-2.6.5). 45 Mäuse wurden pro Versuchsgruppe verwendet. Diese untergliederte sich in 3 Gruppen mit je 15 Tieren; Kontrollgruppe mit Adjuvans in Puffer, sowie zwei Impfgruppen, mit Adjuvans und Voll1 bzw -2. Diese 15er Gruppen untergliederten sich weiter in je 5 Mäuse für die Untersuchung der T-Zellantwort sowie der AK-Titerbestimmungen und in je 10 Tiere für die Belastungsinfektionen. Die Immunisierungsversuche wurden wiederholt und ergaben hierbei reproduzierbare Ergebnisse.

4.1 Vakzinierung der Maus mit *Salmonella*-Impfstamm

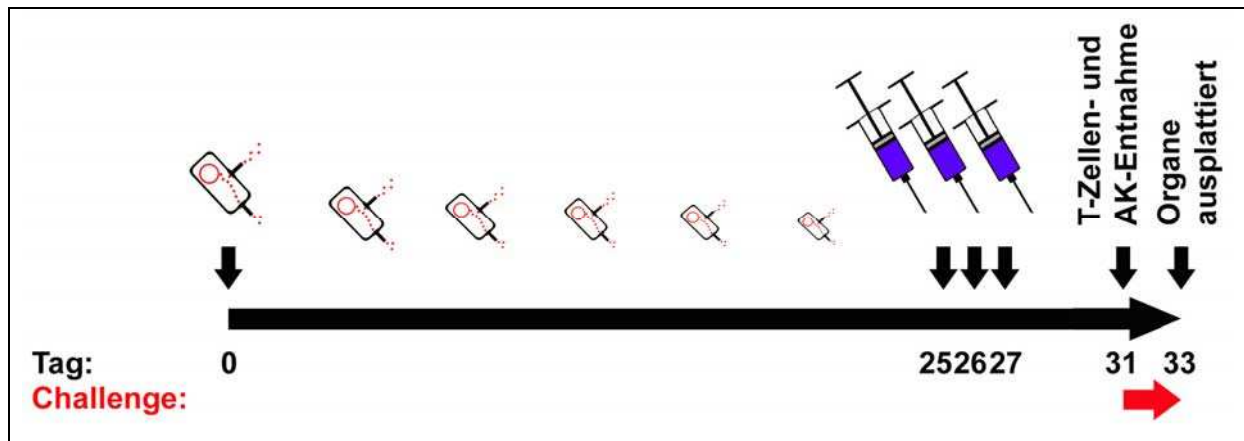


Abb. 23: Zeitplan der T3SS-vermittelten Immunisierung; alle Arbeiten an der Maus sind mit Pfeilen gekennzeichnet und dem Tag zugeordnet. Die Salmonellenbesiedlung nimmt mit der Zeit ab, angedeutet durch das kleiner werdende Symbol. Die Ciprofloxacin-Gabe ist durch blaue Spritzen gekennzeichnet.

Die Impfung der Mäuse mit den Salmonellen SB824-pST1 und -pST2 und dem Kontrollstamm SB824 allein, erfolgte, wie in B 2.6.1 dargelegt, mit einer 22G-Feeding Needle am Tag 0 (s. **Abb. 23**). Die Kulturen für die Vakzinierung wurden gewaschen, in PBS aufgenommen und so verdünnt, dass sich $5 \cdot 10^8$ KBE, in 100 μ l, dem verabreichten Volumen, befanden. Da die Mäuse nach der Immunisierung infektiös sind und die Impfstämme mit dem Kot ausscheiden, könnten sich die Versuchstiere durch Koprophagie reinfizieren. Um eine daraus resultierende Überdosierung zu vermeiden, gleichzeitig aber den Versuch möglichst schonend für die Tiere zu gestalten, wurde auf eine Gitterhaltung verzichtet. Die Mäuse wurden dafür während der drei Tage nach der Immunisierung jeden Tag auf neue Streu umgesetzt. Dabei wurde keine erhöhte Letalität im Vergleich zu den bekannten Letalitätsraten vergleichbarer auf Gitter gehaltenen Gruppen festgestellt (Panthel, persönl. Mitteilg.). Für eine Impfung mit dem System von *Salmonella* Typhimurium SB824 ist eine einmalige Gabe ausreichend, um eine Immunisierung zu erreichen (Domènech 2005), da die Salmonellen im Wirt für über ein Monat persistieren und dabei das Impfstoffprotein weiterhin bilden. Um dies zu überprüfen, wurde die Besiedlung der Mäuse anhand von ausplattierten Organen (Milz und Caecum) über die Zeit untersucht.

Wie in **Abb. 24** und **25** dargestellt, persistieren alle eingesetzten Stämme in der Maus für über drei Wochen. Tiere die mit den Salmonellen-Stamm SB824 ohne Vektor infiziert wurden wiesen eine höhere Keimlast auf als solche die mit den Impfstämmen mit dem Plasmid pST1 bzw. pST2 infiziert wurden. Dabei ist die Zahl der reisolierten Salmonellen mit pST2 höher als die mit pST1. Dies zeigte sich gleichermaßen bei der Reisolierung der Salmonellen aus

der Milz wie auch aus dem Caecum der Maus. Möglicherweise beruht dieser Effekt darauf, dass die beiden Plasmid tragenden Stämme durch die sehr immunogenen und stets produzierten Proteine Vol1 und Vol2 schneller vom Immunsystem eliminiert werden oder die Produktion dieses des Impfantigens der Attenuierung der Virulenz beiträgt. Die schlechtere Persistenz könnte auch die verminderte Anzahl an IFN- γ sezernierenden T-Zellen in der Milz bei pST1 im Vergleich zu pST2 erklären (s. **Abb. 36**).

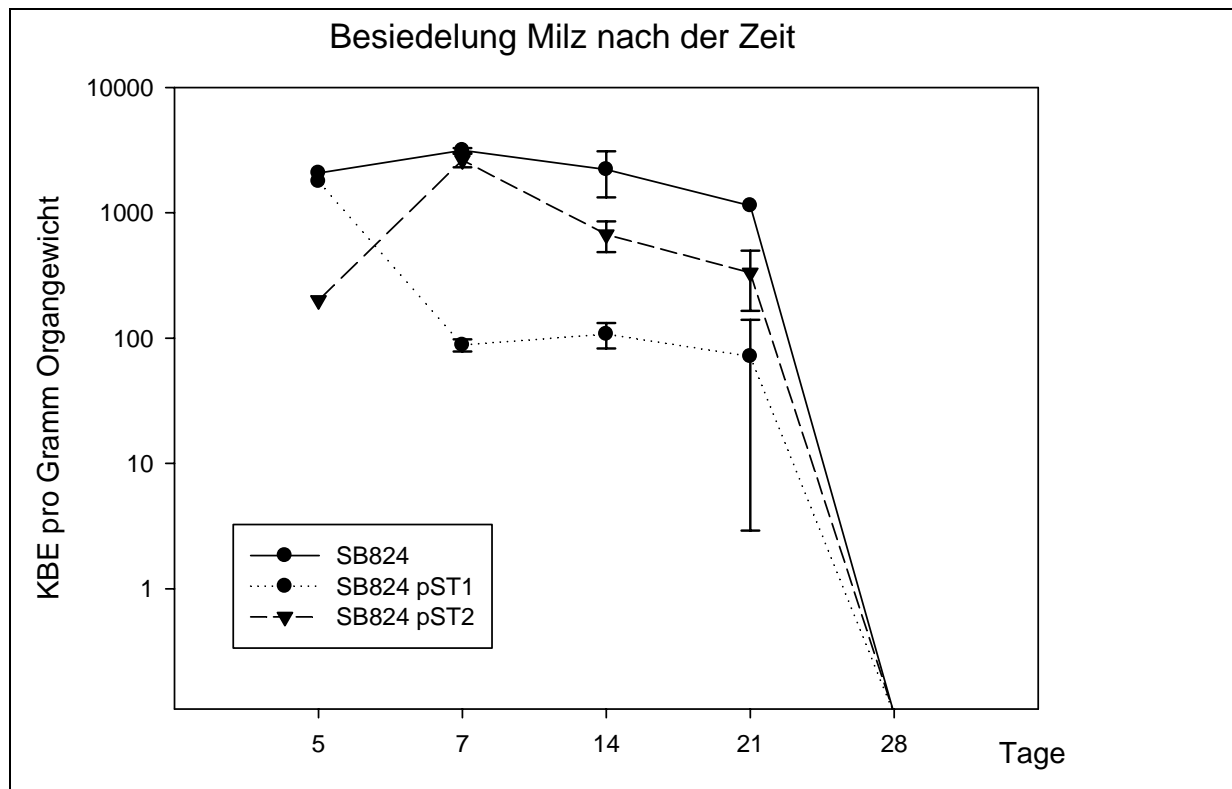


Abb. 24: Persistenz von Salmonellen in der **Mäusemilz** mit *Salmonella enterica* S. Typhimurium in Abhängigkeit von der Zeit. An den Tagen 25, 26 und 27 wurde Ciprofloxacin-Hydrochlorid s.c. verabreicht und die Infektion durch die Impfstämme beendet (n = 10 je Gruppe).

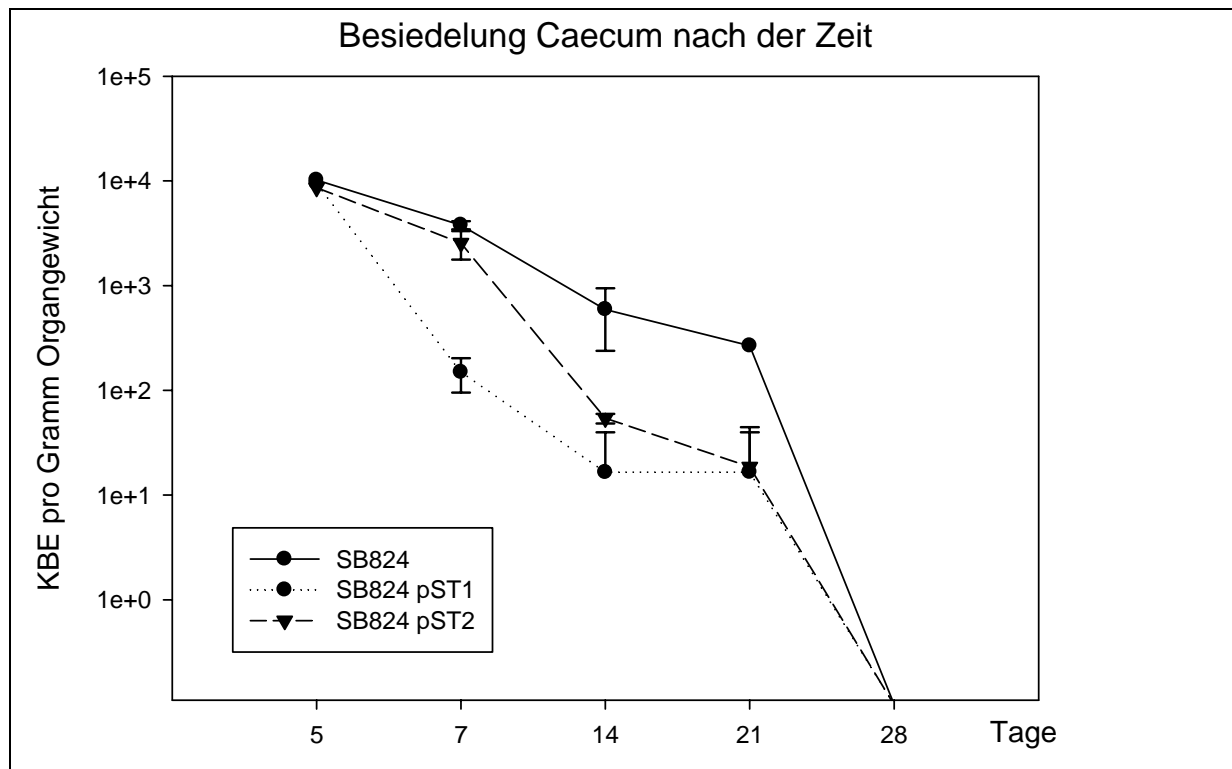


Abb. 25: Erregerpersistenz im **Mäusecaecum** mit SB824-Stamm in Abhängigkeit von der Zeit. An den Tagen 25, 26 und 27 wurde Ciprofloxacin-Hydrochlorid s.c. verabreicht und die Infektion durch die Impfstämme beendet. (n = 10 je Gruppe)

Um zu überprüfen, ob die Salmonellen im Laufe der Infektion auch immer noch das Plasmid tragen und damit vermutlich das Impfstoffprotein weiterhin exprimieren, wurden die bei der Überprüfung der Besiedlung gewonnenen Salmonellen auf Resistenzplatten für Streptomycin und Ampicillin ausplattiert. Die Streptomycinresistenz ist allen in dieser Arbeit benutzten Salmonellenstämmen eigen und hilft Kontaminanten zu unterdrücken. Die Ampicillinresistenz jedoch ist nur in jenen Klonen vorhanden, die auch das Plasmid für die Impfstoffproteine Vol1 oder -2 tragen.

Es wurden stets 100 (wenn nicht möglich, dann so viele wie verfügbar) KBE, aus den Organen isolierte Kolonien, auf jeweils Streptomycin- und Ampicillinplatten vereinzelt und stichprobenartig mittels PCR auf das Vorhandensein der synthetischen Gene für Vol1 bzw. Vol2 überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei allen auf den Platten angewachsenen Kolonien um Salmonellen handelte und dass alle Klone mit Ampicillinresistenz auch das erwartete Plasmid aufwiesen. Die Plasmide erwiesen sich als außerordentlich stabil, sodass sie sogar nach drei Wochen noch bei nahezu 100 % der Isolate vorlagen. Dies gilt in gleicher Weise sowohl für die aus der Milz als auch die aus dem Darm reisolierten Stämme (s. **Abb. 26** und **27**).

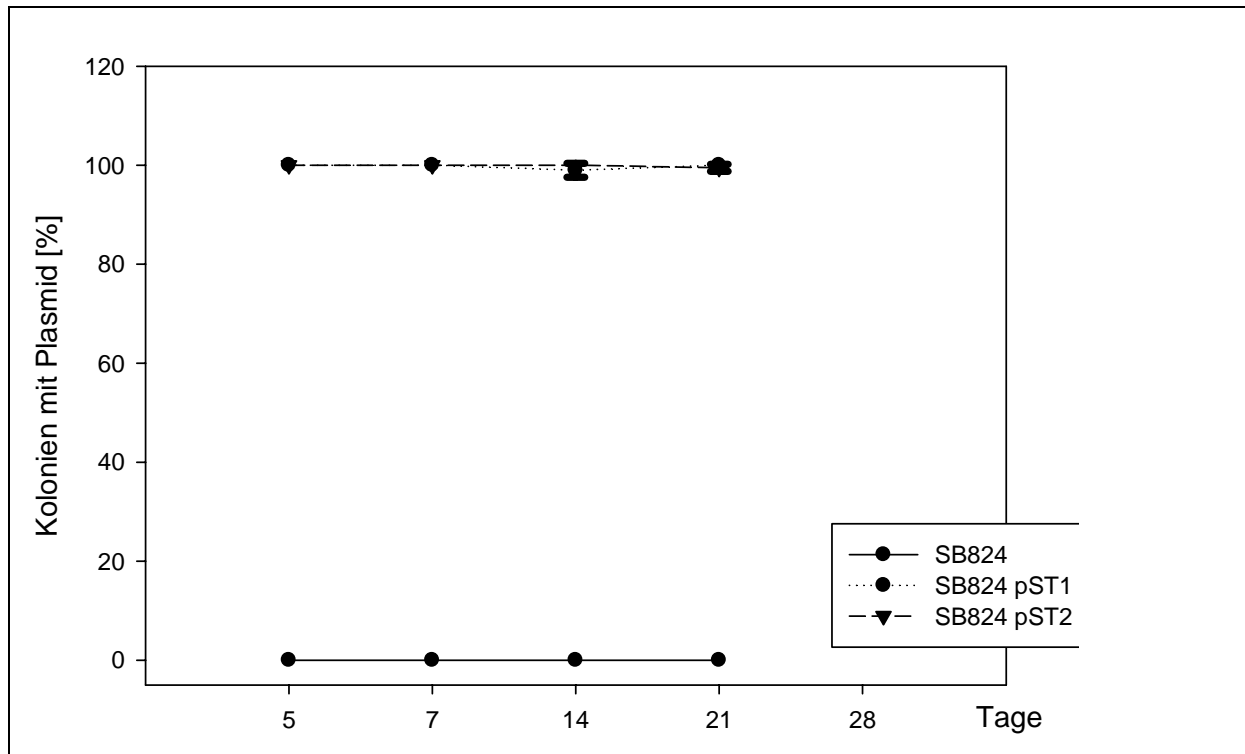


Abb. 26: Plasmidstabilität während des Infektionsverlaufes bei Reisolaten aus der Milz

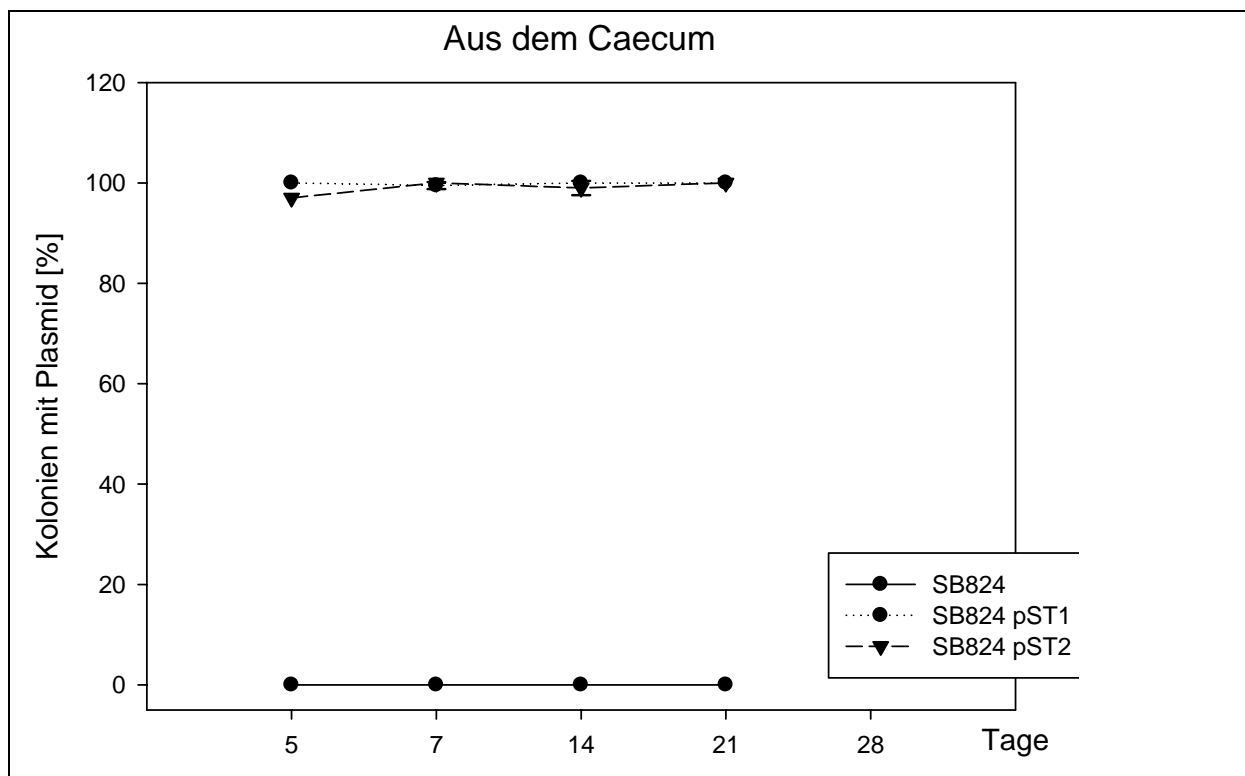


Abb. 27: Plasmidstabilität während des Infektionsverlaufes bei Reisolaten aus dem Caecum

Da sich bei Vorversuchen zeigte, dass auch nach 31 Tagen noch eine gewisse Anzahl an Salmonellen in der Milz vorhanden war, wurden, um Verfälschungen in den T-Zellen-

Stimulations-Assays zu vermeiden, die verbliebenen Keime mit s.c. Antibiotika-Injektion eliminiert. Dazu wurden an den Tagen 25, 26 und 27 je 0,02 mg (= 20 mg/kg KG) das bakterizid wirkende Ciprofloxacin-Hydrochlorid in 50 µl A_{bidest} gelöst, verabreicht. Dies bewirkte, wie aus den **Abb. 24** und **25** ersichtlich, eine vollständige Elimination des Erregers, sowohl im Caecum als auch in der Milz. Gleichzeitig ist durch den ausreichenden zeitlichen Abstand zwischen der letzten Antibiotikagabe (Tag 27) und der bakteriellen Challenge-Infektion (Tag 31) eine Nachwirkung des Ciprofloxacins ausgeschlossen, da dessen Eliminations-Halbwertszeit in der Maus bei etwas unter 1 h liegt (Scaglione et al. 2003).

4.2 Intranasale Vakzinierung der Maus

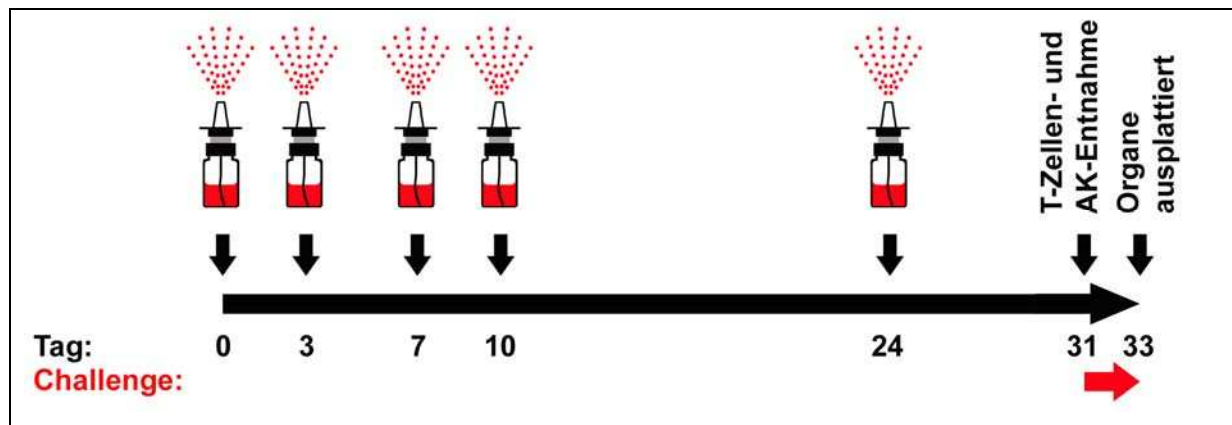


Abb. 28: Impfprotokoll der **intranasalen** Immunisierung; alle Eingriffe an der Maus sind mit Pfeilen gekennzeichnet und dem Tag zugeordnet. Nasale Impfstoffgaben sind durch das Symbol eines Nasensprays gekennzeichnet; AK = Antikörper

Für die intranasale Immunisierung mit den rekombinant exprimierten und aufgereinigten Multi-Epitop-Proteinen Vol1 und Vol2 sowie Cholera-toxin (CT) als Adjuvans (Campos et al. 2003), wurden die in **Tab. 11** beschriebenen Lösungen angesetzt. Jeder Maus wurden unter Diethyläther-Kurz-narkose (s. B 2.6.2) jeweils 10 µl der Impflösung (aus Impfstoffprotein der Konzentration 30 µg/20 µl, PBS sowie CT 1 µg/20 µl als Adjuvans) pro Nasenloch verabreicht. Diese Immunisierung wurde in gleicher Weise fünfmal, also an den Tagen 0, 3, 7, 10 und 24 nach einem Booster-Schema durchgeführt. Dabei erwiesen sich die Impflösungen als exzellent verträglich; zu keiner Zeit während der Immunisierung wurden Auffälligkeiten bei den Versuchsmäusen festgestellt. Diese wurden über den Versuchszeitraum mit wöchentlichem Umsetzen auf Streu gehalten. Wie bei allen anderen Versuchen erfolgten am 31. Tag die Milzzellengewinnung und Belastungsinfektion.

| Darreichung: | Protein: | Konz. Impflösung: | Zusammensetzung je Maus: |
|--------------|----------|-------------------------------|---|
| i.n. | Vol1 | 30 µg/20 µl CT: 1 µg/20 µl | 4,84 µl Vol1 Stock + 1 µl CT + 14,16 µl PBS |
| | Vol2 | 30 µg/20 µl CT: 1 µg/20 µl | 5,46 µl Vol2 Stock + 1 µl CT + 13,54 µl PBS |
| | - | - CT: 1 µg/20 µl | 5 µl Puffer* + 1 µl CT + 15 µl PBS |

Tab. 11: Impfstoffzusammensetzung für intranasale (i.n.) Applikation. Die grau hinterlegte Spalte ist die Kontrolle mit Adjuvans und Proteinpuffer (*) (s. Material)

4.3 Intramuskuläre Vakzinierung der Maus

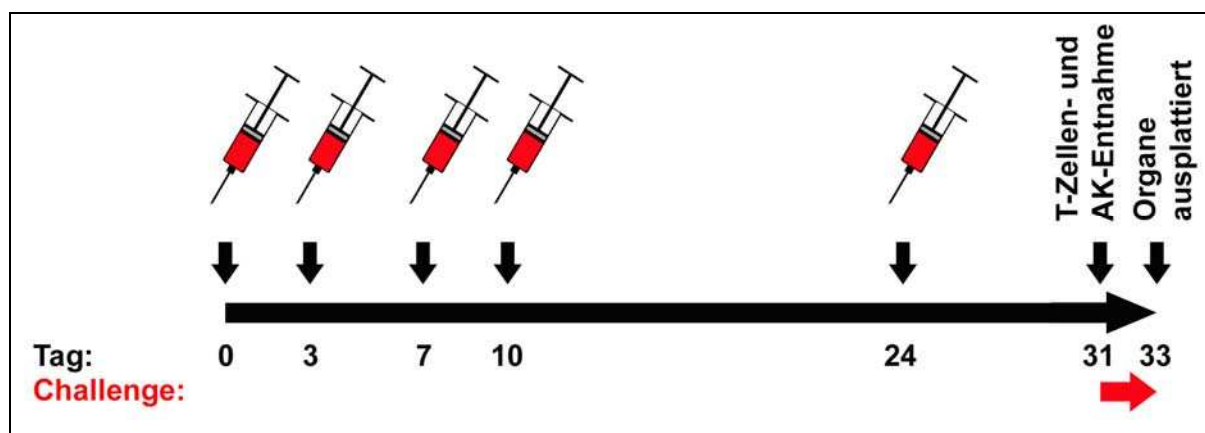


Abb. 29: Protokoll der **intramuskulären** Immunisierung; alle Arbeiten an der Maus sind mit Pfeilen gekennzeichnet und dem Tag zugeordnet. Intramuskuläre Impfstoffgaben sind durch das Symbol einer roten Spritze gekennzeichnet. AK = Antikörper

Bei der intramuskulären Immunisierung wurde der Maus nach einem identischen Booster-Schema wie bei der intranasalen Immunisierung an den Tagen 0, 3, 7, 10 und 24 der Impfstoff verabreicht. Dies geschah in einem Gesamtvolumen von 100 µl in den Musculus glutaeus maximus der Maus (s. B 2.6.8). Als Adjuvans kam MF59C (s. Material) zum Einsatz, das in der Humanmedizin ebenfalls für i.m. Impfungen, etwa gegen Influenza, eingesetzt wird. In der Impflösung hatten die Impfstoffproteine Vol1 bzw. Vol2 eine Endkonzentration von 15 µg/100 µl (halbe Antigenmenge wie bei intranasaler Verabreichung), alle weiteren Einzelheiten über die Zusammensetzung sind in **Tab. 12** aufgeschlüsselt. Um eine zu starke Belastung einer Seite zu vermeiden, erfolgte die Injektion immer abwechselnd auf den kontralateralen Seiten der Maus. Die Impflösung erwies sich als gut verträglich; bei den Versuchstieren wurden weder Beeinträchtigungen noch Auffälligkeiten durch die Immunisierung bemerkt. Die Mäuse wurden auf Streu mit Käfigwechsel (einmal pro Woche) gehalten. Am Tag 31 erfolgten die Milzzellengewinnung, die Probenentnahme für die AK-ELISAs und die Challenge-Infektion.

| Darreichung: | Protein: | Konz. Impflösung: | Zusammensetzung je Maus: |
|----------------|----------|-------------------------------------|--|
| i.m. mit MF59C | Voll1 | 15 µg/100 µl MF59C: 50 µg/100 µl | 2,42 µl Voll1 Stock + 47,6 µl PBS + 50 µl MF59C |
| | Voll2 | 15 µg/100 µl MF59C: 50 µg/100 µl | 2,73 µl Voll2 Stock + 47,3 µl PBS + 50 µl MF59C |
| | - | - MF59C: 50 µg/100 µl | 2,5 µl Puffer* + 47,5 µl PBS + 50 µl MF59C |

Tab. 12: Impfstoffzusammensetzung bei intramuskulärer (i.m.) Applikation. Die grau hinterlegte Spalte ist die Kontrolle mit Adjuvans und Proteinpuffer (*) (s. Material). Genaue Zusammensetzung von MF59C (s. B 1.10)

C 5. Untersuchung der humoralen und zellulären Immunantwort

Die Immunantwort auf die verschiedenen Impfungen mit den beiden Multi-Epitop-Proteinen Voll1 und Voll2 wurde nach humoraler und zellulärer Ebene getrennt analysiert. Die zelluläre Immunantwort (CD4- und CD8- Antwort) wurde mit dem ELISpot-Assay (B 2.5.2) evaluiert. Dabei wurden die steril entnommenen Milzzellen *in vitro* mit den rekombinant hergestellten, aufgereinigten Impfstoffproteinen Voll1 oder Voll2 restimuliert und jeweils in 1 Million Splenozyten die IFN- γ sezernierenden Zellen von 10^6 Milzzellen ausgezählt. Bei Letzteren handelt es sich um durch Kreuz-Präsentation aktivierte CD8-positive T-Zellen, sowie um auf herkömmlichem Weg durch Präsentation von Oligopeptid-Epitopen auf MHC-II aktivierte, IFN- γ sezernierende T-Helfer Zellen (CD4-positiv). Der separate Nachweis der beiden oben beschriebenen Populationen gelang mit dem Miltenyi-IFN- γ -Secretion-Assay (B 2.5.3) und einer Zweitfärbung gegen CD4 oder CD8.

Der Nachweis einer humoralen Immunantwort erfolgte durch AK-Titerbestimmungen mit einem ELISA (B 2.5.1). Dabei wurden neben den Serumspiegeln von IgG/IgM auch jene von IgA im Vaginalsekret gemessen. Um bei diesem Verfahren, das ohne Standard auskommen muss, immer aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, wurden stets die Null- und Endwerte einer Maus auf derselben ELISA-Platte bestimmt und so der Anstieg des Titers errechnet. Dazu wurde bei Bestimmung des Serum-IgG/IgM der Quotient aus der OD₄₀₅ des Napfes nach der Immunisierung und der OD₄₀₅ von vor der Immunisierung gebildet. Es wurde für Mausserum immer die Verdünnungsstufe 1:500, für Vaginallavagen die Verdünnungsstufe 1:100 herangezogen. So zeigt sich ein Titeranstieg durch einen Quotienten von >1 .

5. 1 Untersuchung der Immunantwort nach T3SS-abhängiger Immunisierung

5.1.1 Antikörper in Blut und Vaginallavage

Am Tag 31 wurden Proben aus der Maus entnommen und die AK-Antwort untersucht. Die Titer wurden mittels ELISA gegen das komplette Impfstoff-Protein Vol1 bzw. Vol2 sowie gegen das Kontrollprotein His-DHFR-m45 in Verdünnungsreihen bestimmt. Die Seren wurden außerdem gegen die aufgereinigten Impfstoffproteine Vol1 oder Vol2 geblottet. Als Positivkontrollen für IgG diente der Überstand der m45-Hybridomazellen. Als IgA-Positivkontrolle fungierte das Serum i.n. immunisierter Mäuse (s. C 5.2). Es zeigte sich kein signifikanter Antikörper Titeranstieg im Serum oder Vaginallavage gegen die Impfstoffproteine oder Protein-Tags nach T3SS-abhängiger Vakzinierung (s. **Abb. 30** und **33**). Ferner blieben auch die Western Blots negativ gegen die Impfstoffproteine (s. **Abb. 31, 32, 34** und **35**). Daher konnte bei T3SS-abhängiger Vakzinierung keine weitere Analytik bezüglich der AK-Spezifität durchgeführt werden.

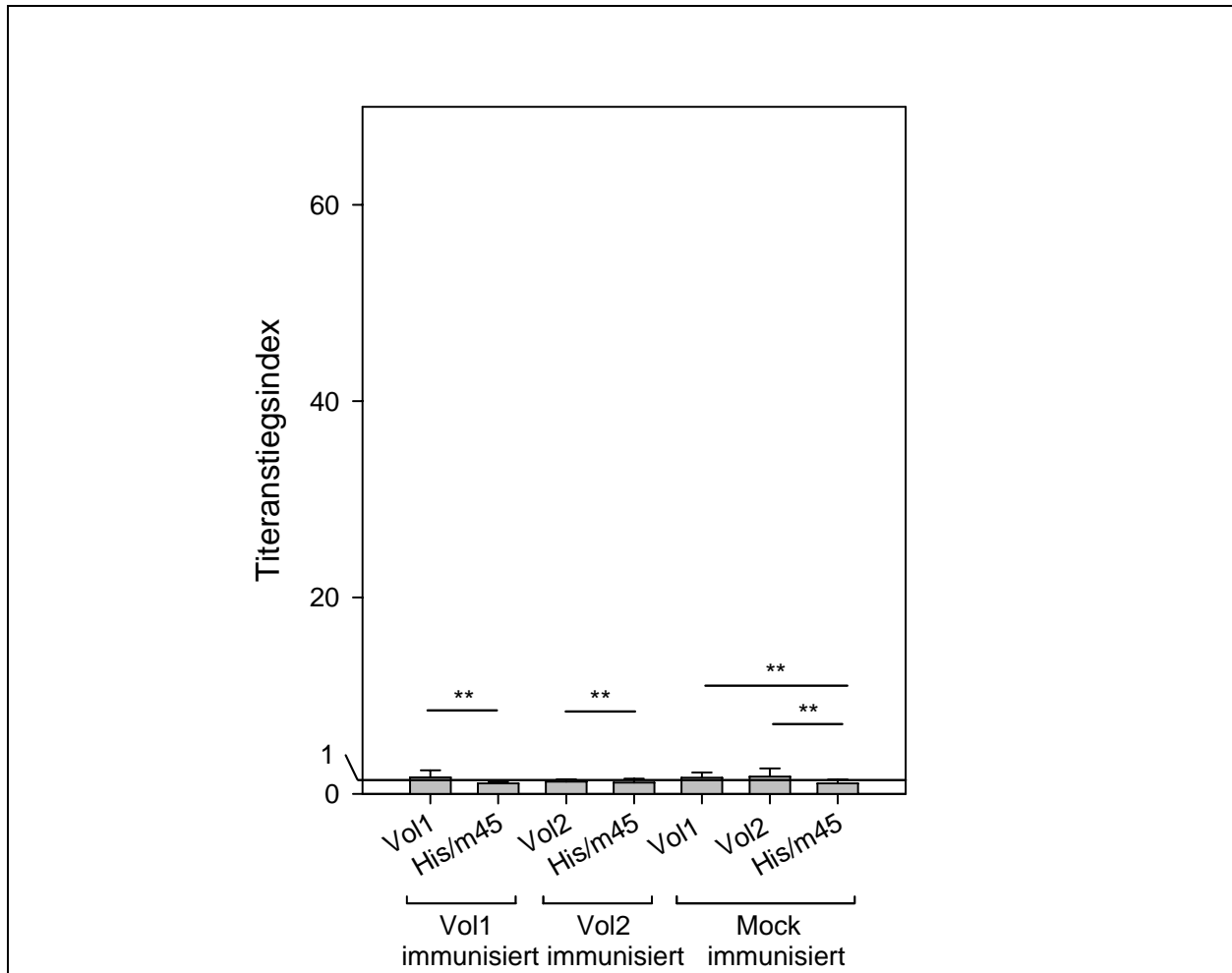


Abb. 30: Serum-IgG/IgM-Titeranstieg spezifisch gegen die Impfstoffproteine Vol1 und Vol2 nach T3SS-abhängiger Immunisierung. Die Mikrotiterplatten wurden mit den Impfstoffproteinen Vol1 oder Vol2 sowie mit dem Kontrollprotein His-DHFR-m45 (His/m45) beschichtet. pST1 (Vol1), pST2 (Vol2) oder SB824 (Mock).
 **: keine signifikante Titeränderung nach Vakzinierung; $p < 0,05$

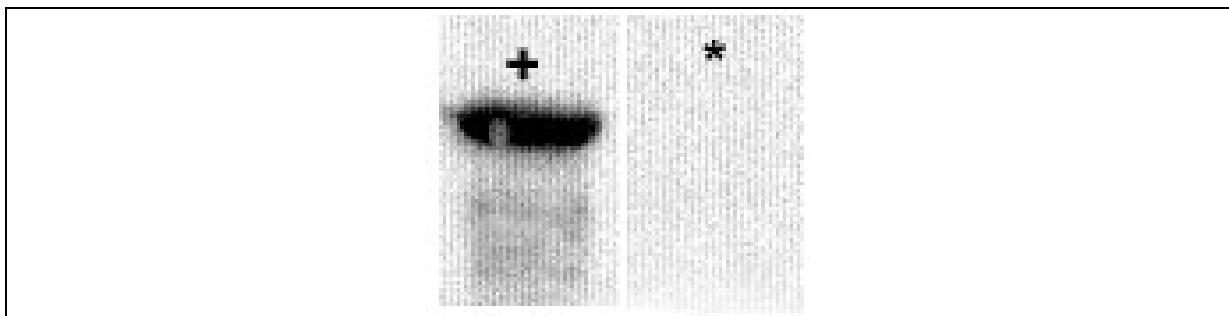


Abb. 31: Western Blot der Impfstoffproteine **Vol1** gegen das Serum einer mit SB824 pST1 immunisierten Maus (*); als Positivkontrolle Mausextrakt einer i.n. immunisierten Maus (+); Mausextrakt 1:2500 verdünnt, zur Detektion Anti-Maus-IgG HRPO 1:10000.

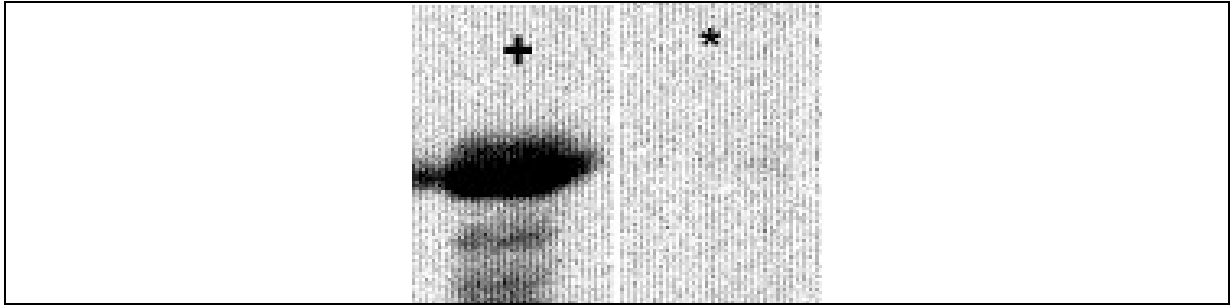


Abb. 32: Western Blot der Impfstoffproteine **Vol2** gegen das Serum einer mit SB824 pST2 immunisierten Maus (*); als Positivkontrolle Mausemum einer i.n. immunisierten Maus (+); Mausemum 1:2500 verdünnt, zur Detektion Anti-Maus IgG HRPO 1:10000.

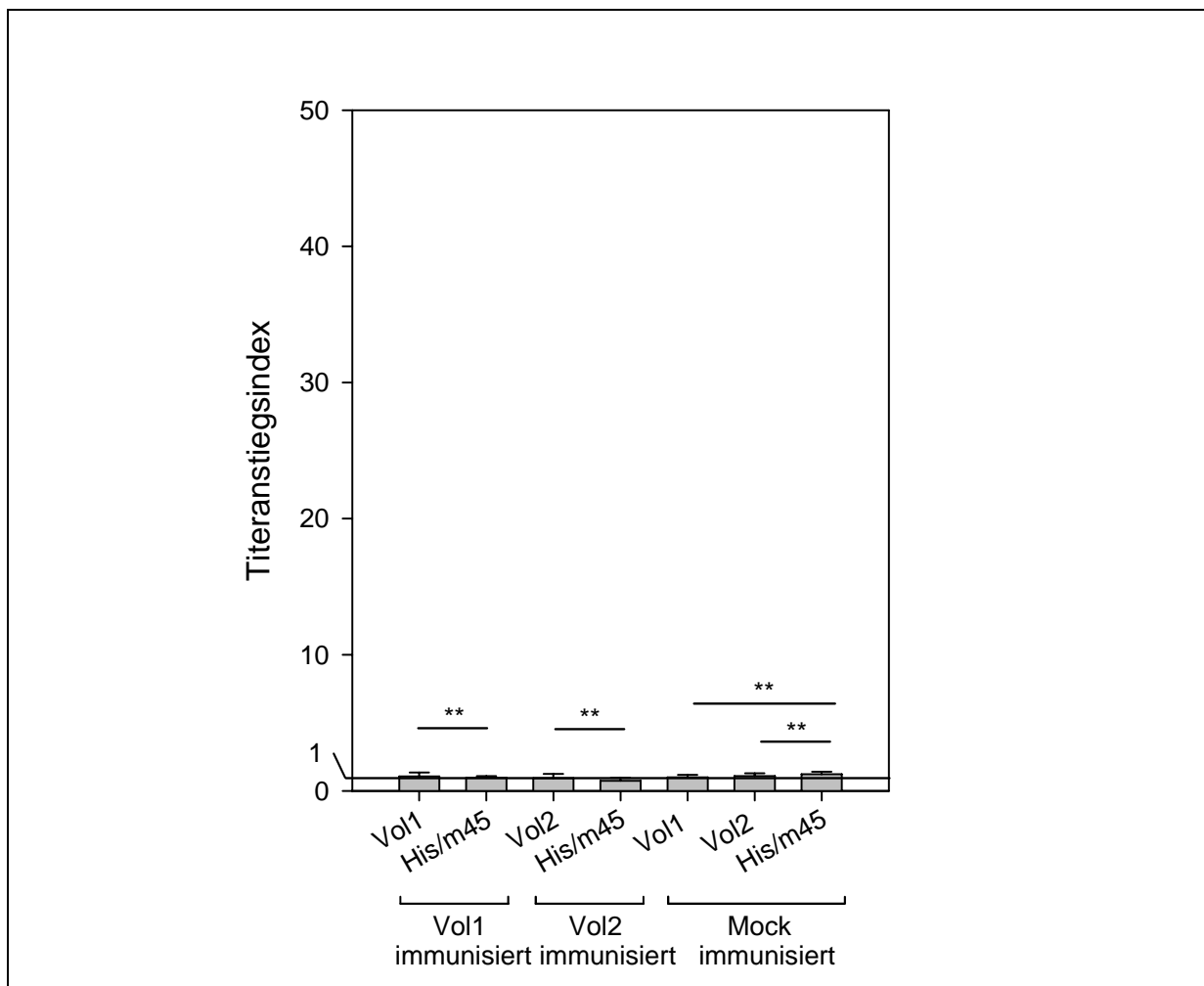


Abb. 33: Vaginallavage-IgA-Titeranstieg spezifisch gegen die Impfstoffproteine Vol1 und Vol2 nach T3SS-abhängiger Immunisierung. Die Platten wurden mit den Impfstoffproteinen Vol1 oder Vol2 sowie mit dem Kontrollprotein His-DHFR-m45 (His/m45) beschichtet. pST1 (Vol1), pST2 (Vol2) oder SB824 (Mock).

** : keine signifikante Titeränderung nach Vakzinierung; $p < 0,05$

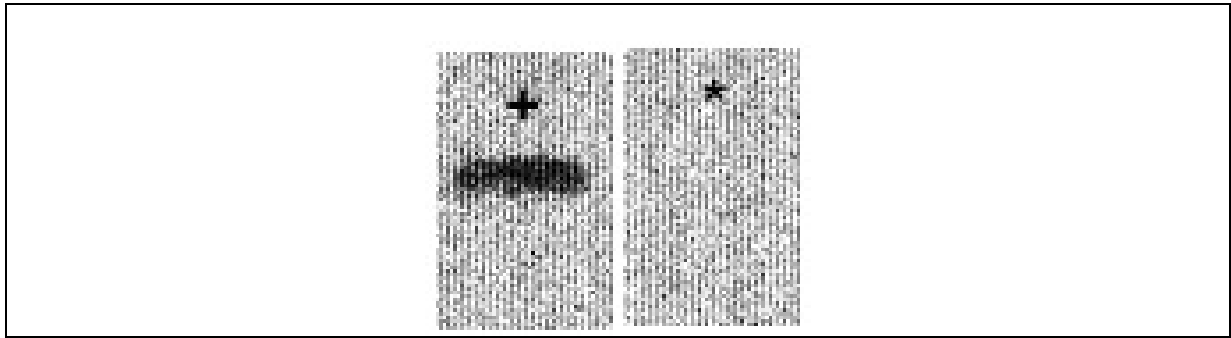


Abb. 34: Western Blot der Impfstoffproteine **Vol1** gegen die Vaginallavage einer mit SB824 pST1 immunisierten Maus (*); als Positivkontrolle Vaginallavage einer i.n. immunisierten Maus (+); Vaginalspülung 1:250 verdünnt, zur Detektion Anti-Maus-IgA HRPO 1:1000.

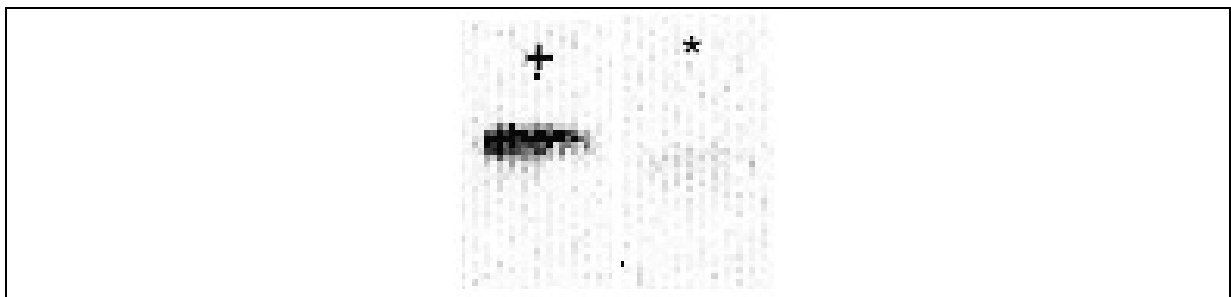


Abb. 35: Western Blot der Impfstoffproteine **Vol2** gegen die Vaginallavage einer mit SB824 pST2 immunisierten Maus (*); als Positivkontrolle Vaginallavage einer i.n. immunisierten Maus (+); Vaginalspülung 1:250 verdünnt, zur Detektion Anti-Maus-IgA HRPO 1:1000.

5.1.2 Zelluläre Immunantwort

Zur Charakterisierung der T-zellulären Antwort auf die Immunisierung wurde ein T-Zell-Restimulations-Assay durchgeführt (B 2.5.2). Dabei wurden Milzzellen der immunisierten Mäuse gewonnen und *in vitro* mit den Impfstoffproteinen Vol1 und Vol2 restimuliert. Die Anzahl der reaktiven IFN- γ sezernierenden Splenocyten wurde ausgezählt. Bei den immunisierten Mäusen wurde gegenüber den Kontrollen eine signifikant erhöhte Anzahl von IFN- γ sezernierenden T-Zellen festgestellt (s. **Abb. 36**). Dies weist eindeutig auf eine spezifische T-Zellimmunantwort gegen die jeweiligen Impfstoffproteine hin.

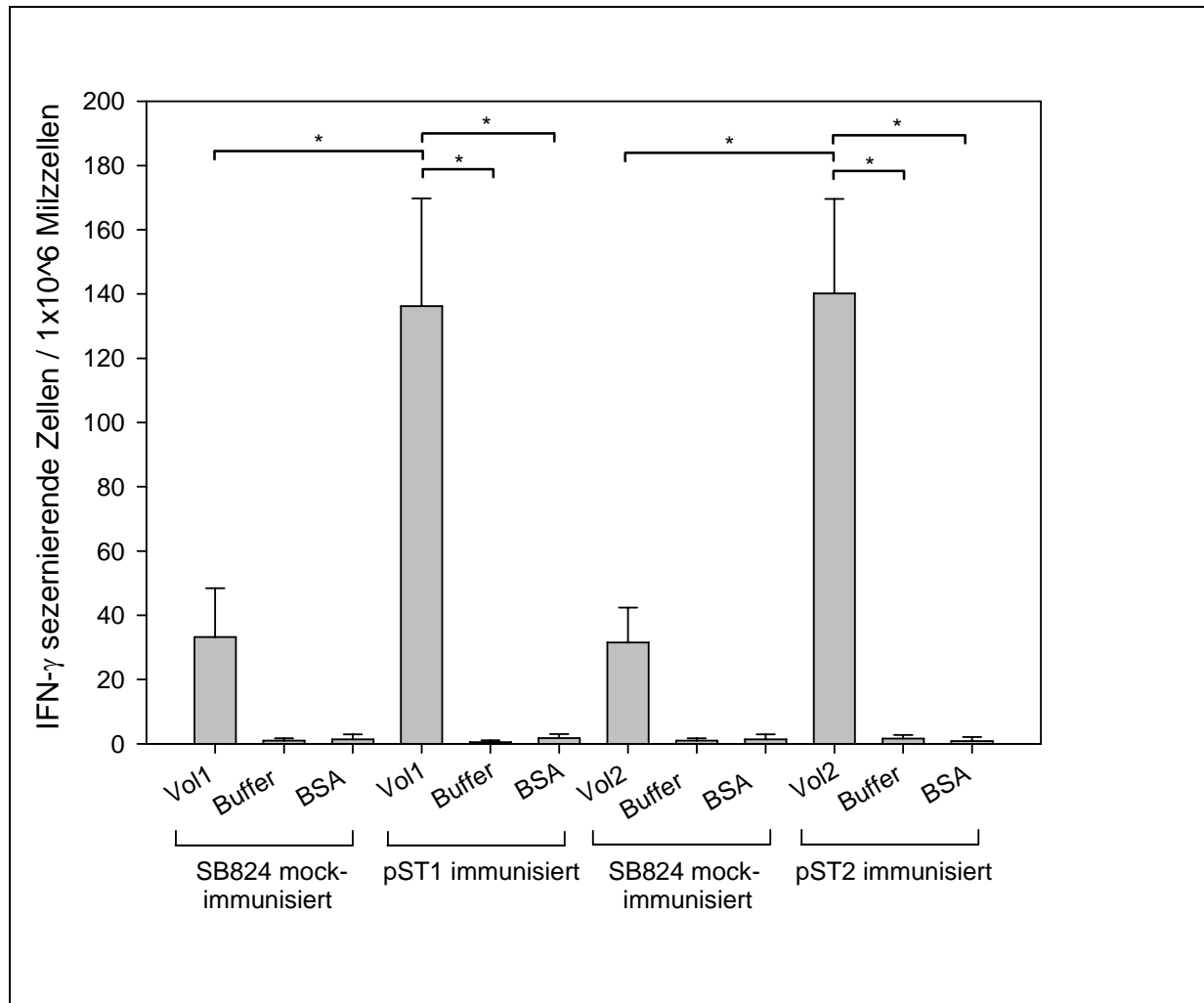


Abb. 36: IFN- γ sezernierende Zellen im ELISpot nach Immunisierung mit SB824-Stämmen und in-vitro-Restimulation mit Puffer, Vol1, Vol2 oder Fraktion V BSA (BSA = Bovines Serum- Albumin);
*: $p < 0,05$; signifikant

Um festzustellen, ob im Rahmen der Impfung sowohl T-Helfer- (CD4+) als auch T-Killer- (CD8+)-Zellen stimuliert wurden, wurde von in vitro restimulierten Milzzellen eine Analyse im Durchflusszytometer durchgeführt. Wie in B 2.5.3 detailliert dargelegt, erfolgte eine Aufreinigung IFN- γ produzierender Zellen sowie eine Gegenfärbung gegen die T-Zellrezeptoren CD4 oder CD8. Es zeigte sich, wie in **Abb. 37** exemplarisch dargestellt, eine verstärkte Aktivierung sowohl von T-Helfer- als auch T-Killer-Zellen durch den Impfstoff verglichen mit Proteinpuffer/BSA. Da es bei diesem Verfahren zu einer Ankonzentrierung der IFN- γ -positiven Zellen kommt, ist eine genaue Quantifizierung der aktivierten Zellen nicht mehr möglich. Diese wurde mit dem ELISpot durchgeführt (s. **Abb. 36**). Ferner sind durch den Aufreinigungsschritt auch bei den nur mit Puffer und BSA stimulierten Milzzellen aktivierte Populationen zu erkennen, weil diese wenigen als Hintergrund immer aktivierten Zellen durch die Aufreinigung überproportional gemessen werden. Da dies keine

aussagekräftige Kontrolle ist, wurde hier auf eine Darstellung der FACS-Ergebnisse einer mock-immunisierten Maus verzichtet.

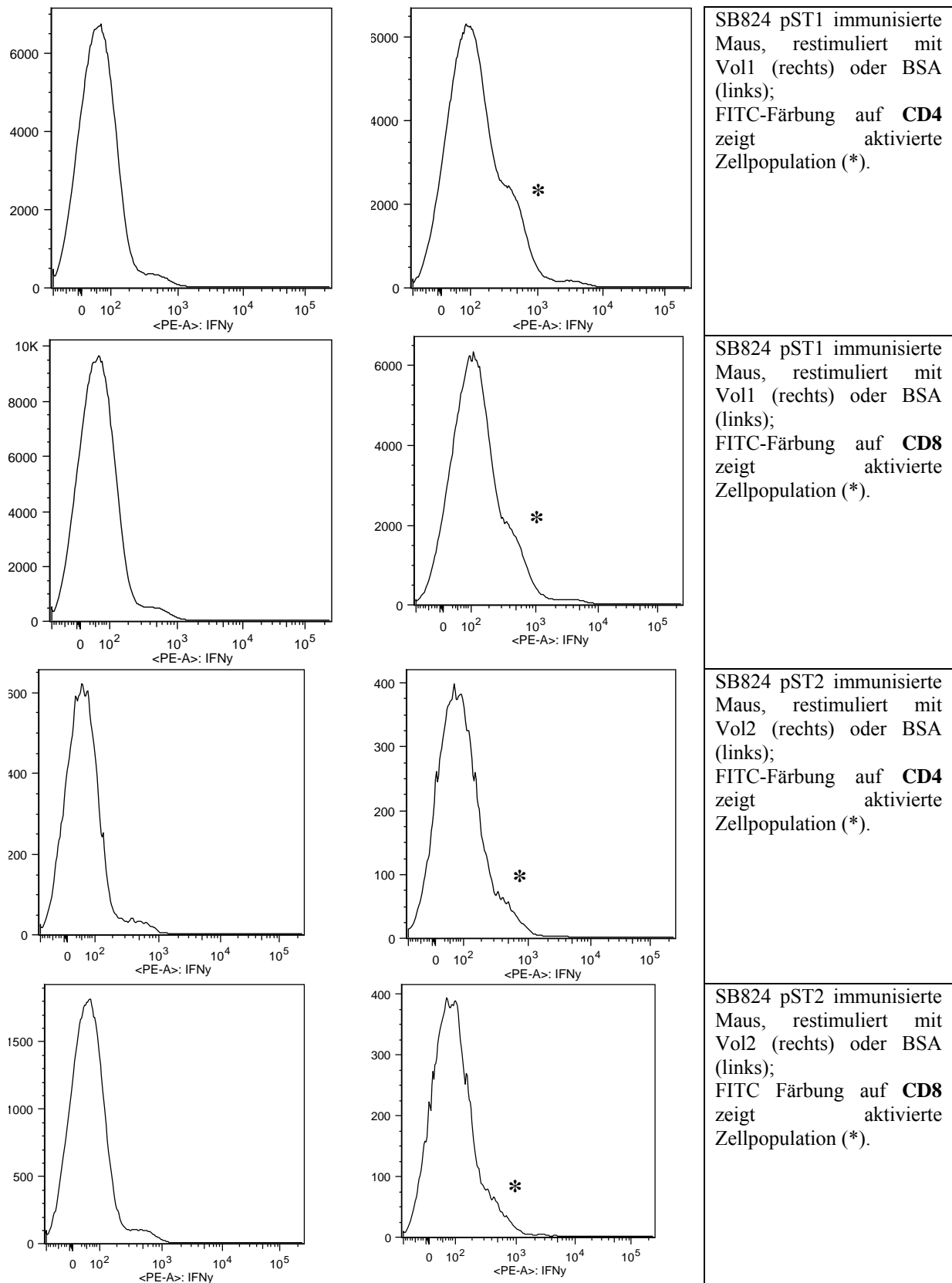


Abb. 37: Durchflusszytometrische Analyse der IFN- γ sezernierenden Zellen nach In-vitro-Restimulation mit dem jeweiligen Impfstoff Voll1 oder Voll2. Nachweis von CD4⁺ und CD8⁺ reaktiven Zellen.

5.2 Untersuchung der Immunantwort nach intranasaler Vakzinierung

5.2.1 Antikörper in Blut und Vaginallavage

Die spezifischen AK-Titer wurden mittels ELISA an den Tagen 1 und 31 gemessen und wie bei C 5. beschrieben, ausgewertet. Als Kontrolle diente dabei das Protein His-DHFR-m45.

Es zeigte sich ein starker spezifischer Titeranstieg sowohl von Serum-IgG/IgM als auch von sIgA bis zu einem Titer von über 1:500.000 bei den mit Vol1 oder Vol2 immunisierten gegenüber den scheinimmunisierten (Adjuvans und Puffer) Tieren. Zugleich war kein nennenswerter Titeranstieg gegen das Kontrollprotein His-DHFR-m45 zu verzeichnen (s. **Abb. 38** und **40**). Dies legt nahe, dass die AK-Antwort vor allem gegen die Multi-Epitop-Sequenz gerichtet ist und nicht gegen die N- und C-terminalen Tags, welche in identischer Sequenz auch im Kontrollprotein vorkommen. Die Mäuseren wurden ferner gegen die Impfstoffproteine Vol1 und -2 geblottet und es zeigte sich anhand der ELISA-Titer eine deutliche spezifische Reaktion gegen die Impfstoffproteine (s. **Abb. 39** und **41**).

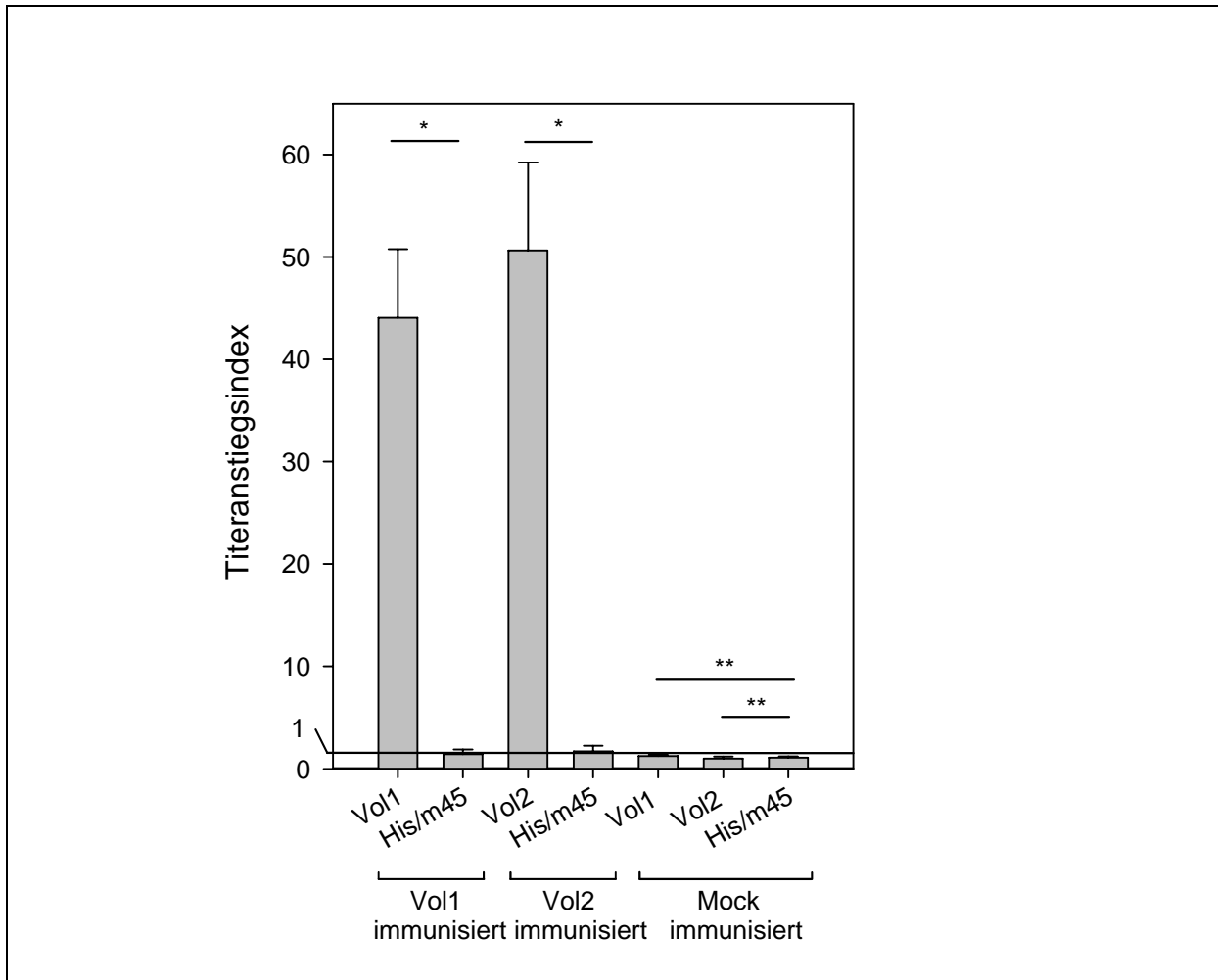


Abb. 38: Serum-IgG/IgM-Titeranstieg spezifisch gegen die Impfstoffproteine Vol1 und Vol2 nach intranasaler Immunisierung. Die Platten wurden mit den Impfstoffproteinen Vol1 oder Vol2 sowie mit dem Kontrollprotein His-DHFR-m45 (His/m45) beschichtet.

Titeranstiegsindex errechnet anhand der optischen Dichte bei der Verdünnung 1:500

*: $p < 0,05$; signifikant; **: $p > 0,05$; nicht signifikant

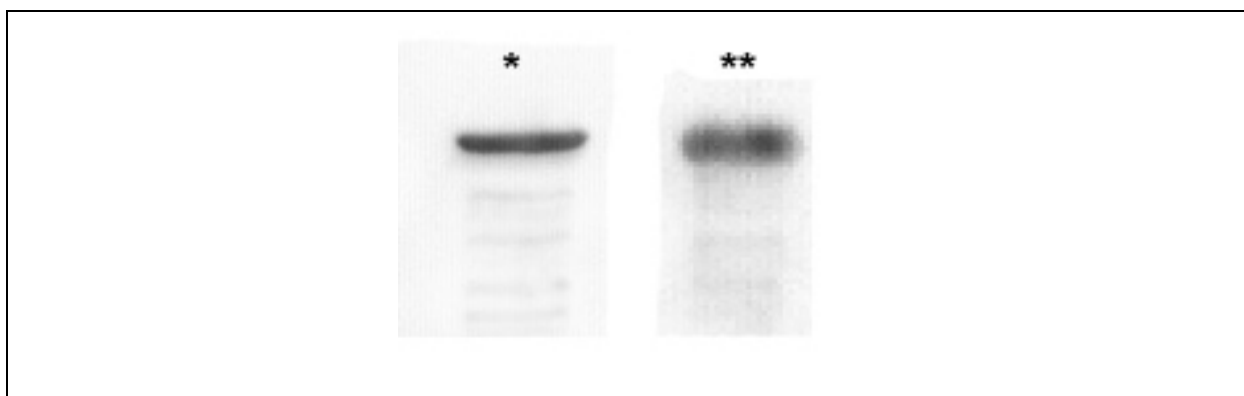


Abb. 39: Western Blot der Impfstoffproteine Vol1 (*) und Vol2 (**) gegen das Serum einer jeweils damit intranasal immunisierten Maus; Mausserum 1:2500 verdünnt, zur Detektion Anti-Maus-IgG HRPO 1:10.000.

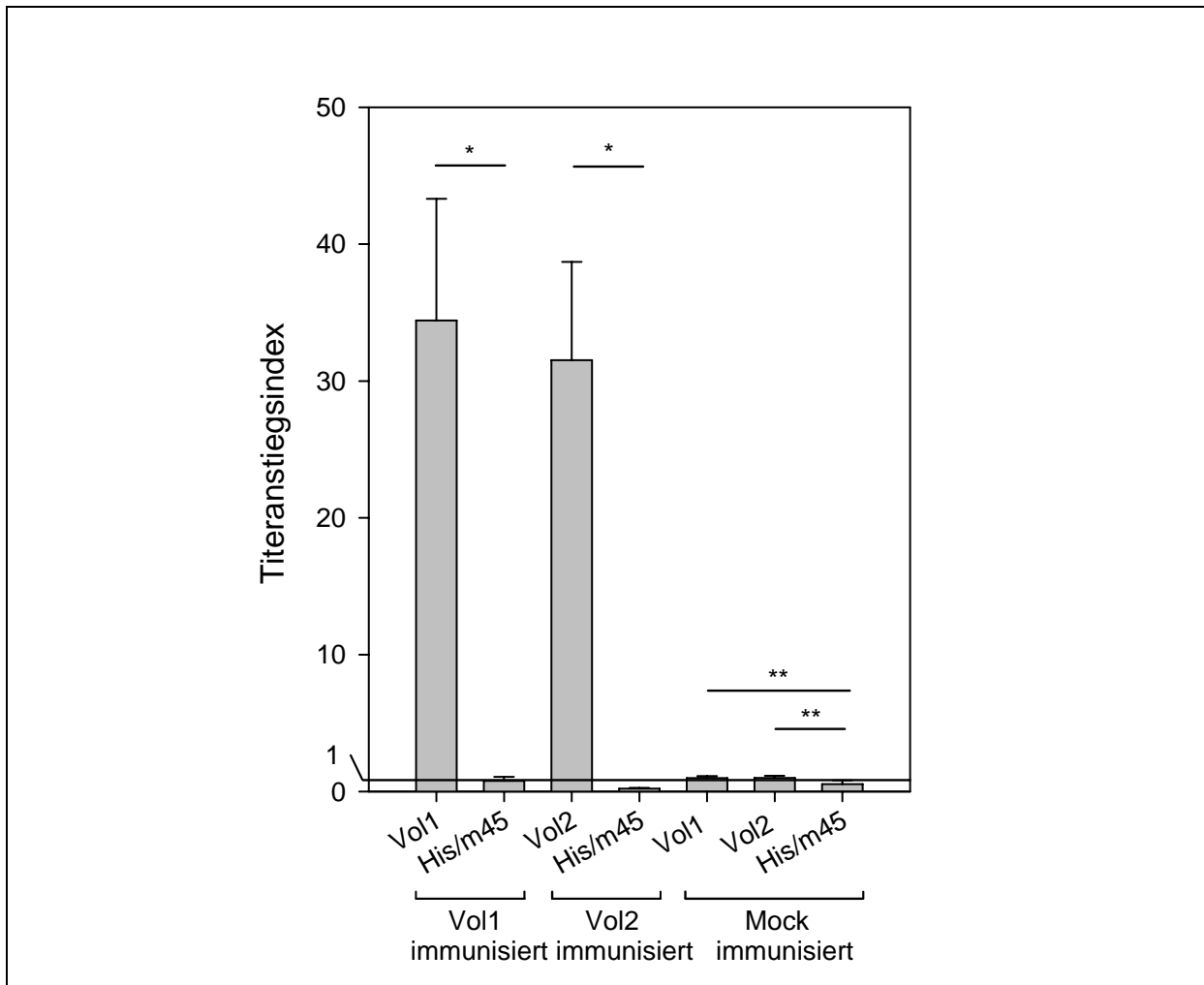


Abb. 40: Vaginallavage-IgA-Titeranstieg spezifisch gegen die Impfstoffproteine Vol1 und Vol2 nach **i.n.** Immunisierung (ELISA). Antigene: Vol1, Vol2 und Kontrollprotein His-DHFR-m45. Negative Kontrollimmunisierung (Mock) mit Probenpuffer und CT.

Als letztes in der Legende angegeben ist die Immunisierung; Anstiegsindex anhand der 1:100 Verdünnung berechnet.

*: $p < 0,05$; signifikant; **: $p > 0,05$; nicht signifikant

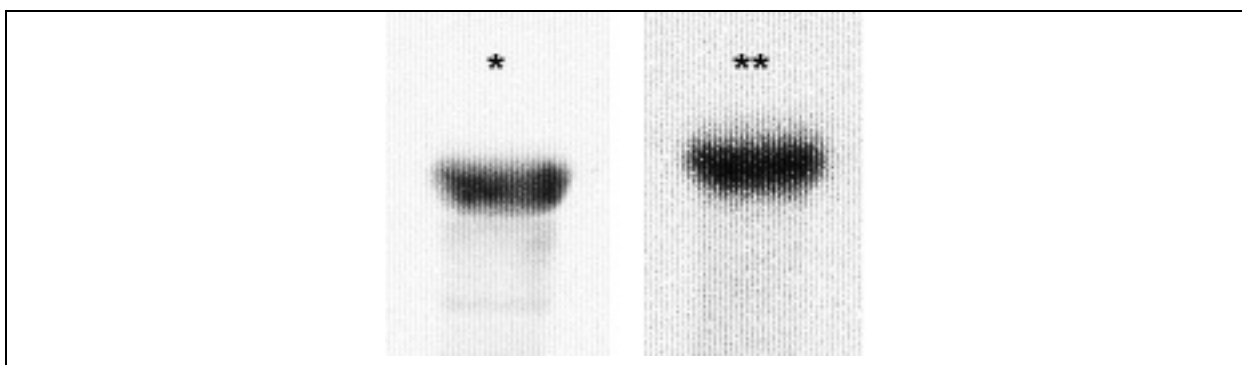


Abb. 41: Immunoblot der Impfstoffproteine Vol1 (*) und Vol2 (**) gegen Vaginallavagen (Verdünnung 1:250) einer jeweils damit **i.n.** immunisierten Maus; Detektion: Anti-Maus-IgA HRPO 1:1000.

Um einzugrenzen gegen welche Epitope die AK gerichtet sind, wurden Western Blots gegen die Volllängen-Proteine Iha, Usp, FyuA, IroN und ChuA durchgeführt, von denen die Epitope abgeleitet wurden. Da es nicht gelang IutA und IreA als Gesamtprotein in *E. coli* zu exprimieren, wurden synthetische Polypeptide bestellt (IutA 1, 2, 3 und IreA 1, 2), die genau den in Vol1 bzw. Vol2 eingesetzten Epitopen entsprechen. Da das Auftragen solch kleiner Peptide zusammen mit den Kontrollen der Impfstoffproteine Vol1 und Vol2 sowie His-DHFR-m45 in einem Polyacrylamid-Gel keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte, wurde die AK-Bindung an die Polypeptide im Dot-Blot-Verfahren (B 2.2.6) getestet. Es wurde immer gegen IgG und IgA aus dem Serum der immunisierten Mäuse geblottet (s. **Abb. 42** und **43**).

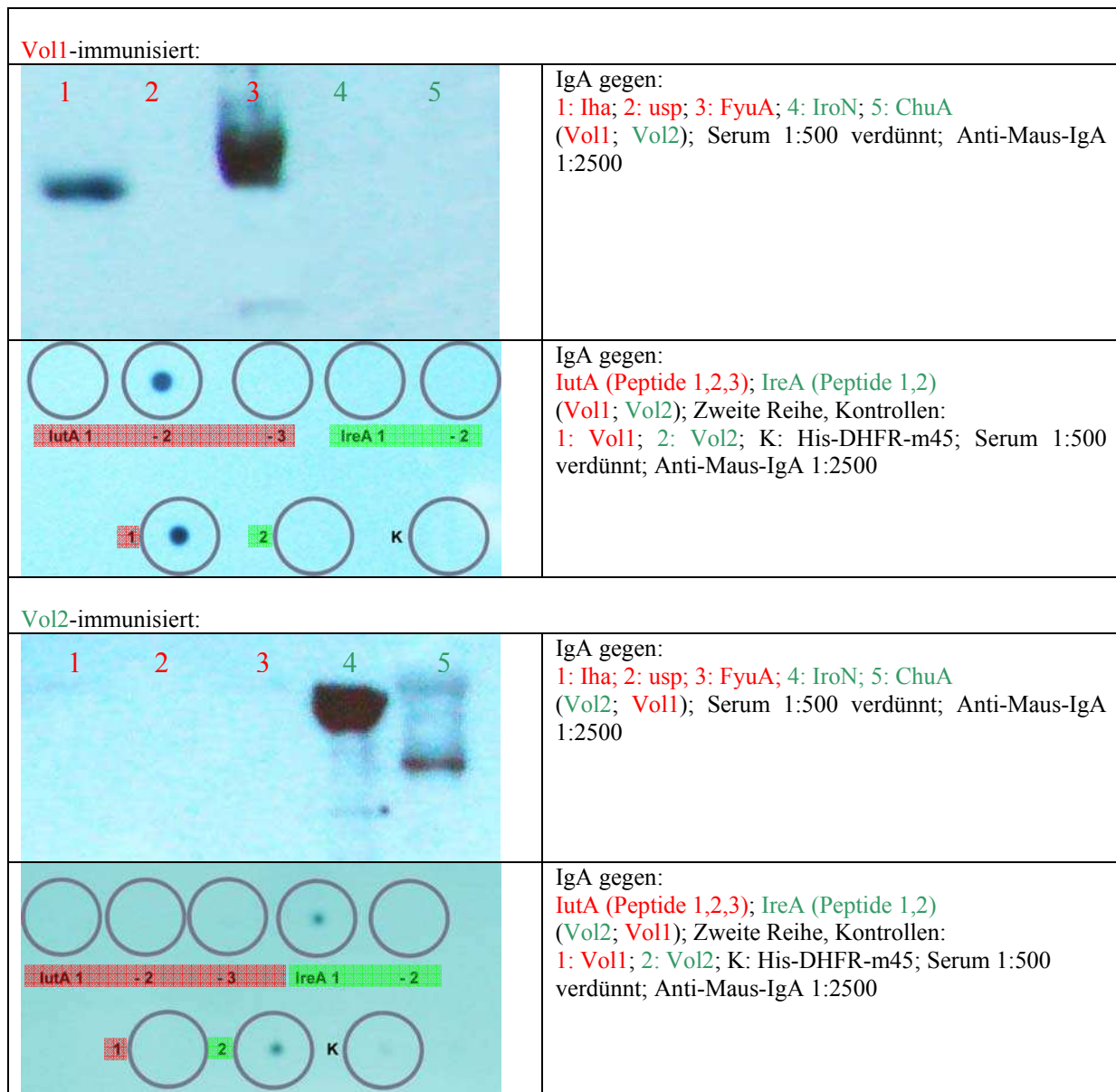


Abb. 42: Western Blots – IgA

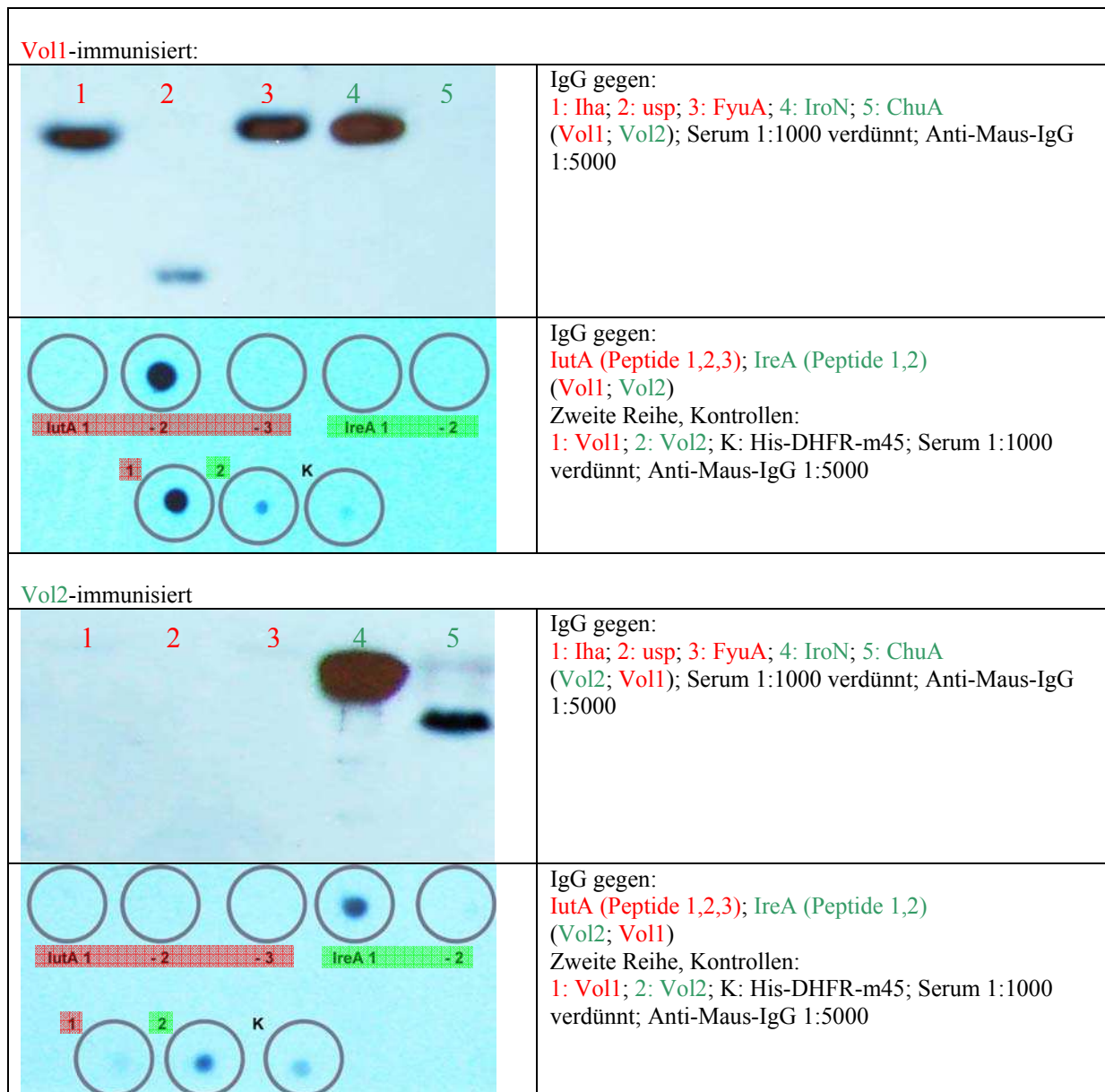


Abb. 43: Western Blots – IgG

5.2.2 Zelluläre Immunantwort

Nach intranasaler Gabe der Impfstoffproteine Vol1 und Vol2 mit CT als Adjuvans wurde ergänzend zur Serum-Antikörperantwort ebenfalls die zelluläre Immunantwort, wie unter C 5. beschrieben, analysiert. Es konnte eine spezifische T-Zellantwort im ELISpot nachgewiesen werden. Diese übertraf die durch die Immunisierung mit den Salmonellen erzielten Werte (s. **Abb. 44** und **36**). Als Kontrollen für die In-vitro-Stimulation der Milzzellen wurden reines Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion V und Impfstoffprotein-Puffer gewählt. Beide Kontrollen zeigten praktisch keine spezifischen T-Zellen, wohingegen die Impfstoffe auch bei den nur

mit Puffer behandelten Mäusen (Negativkontrolle) im ELISpot zu einer geringen Reaktion führten.

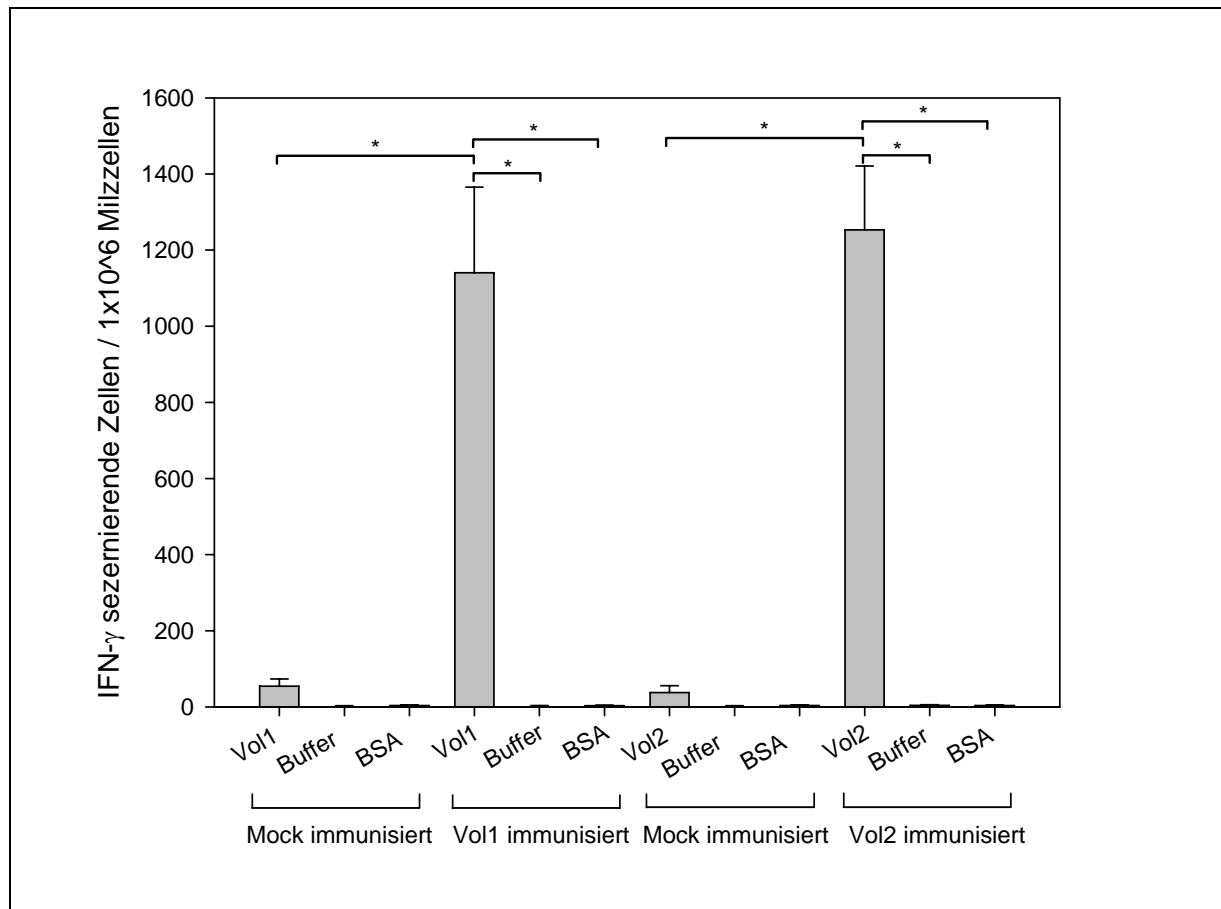


Abb. 44: IFN- γ sezernierende Zellen im ELISpot nach intranasaler Immunisierung und In-vitro-Restimulation mit Puffer, Vol1, Vol2 oder BSA; *: $p < 0.05$; signifikant

Um zu untersuchen, ob bei den IFN- γ sezernierenden T-Zellen sowohl T-Helfer- (CD4+) als auch T-Killer- (CD8+)-Zellen enthalten sind, wurde von restimulierten Milzzellen eine Analyse im Durchflusszytometer durchgeführt. Wie aus B 2.5.3 ersichtlich, erfolgte danach eine Aufreinigung IFN- γ produzierender Zellen sowie eine differentielle Immunfärbung für die T-Zellrezeptoren CD4 oder CD8. Es zeigte sich (in **Abb. 45** exemplarisch dargestellt) eine verstärkte Aktivierung sowohl von CD4 positiven T-Helfer- als auch CD8 positiven T-Killer-Zellen durch den Impfstoff, verglichen mit Proteinpuffer/BSA. Da es bei dem Verfahren zur Aufreinigung und Ankonzentrierung der IFN- γ -positiven Zellen kommt, ist eine genaue Quantifizierung der aktivierten Zellen nicht mehr möglich. Diese wurde mittels ELISpot durchgeführt (s. **Abb. 44**). Ferner sind durch den Aufreinigungsschritt auch bei den nur mit Puffer und BSA stimulierten Milzzellen aktivierte Populationen zu erkennen, da diese wenigen als Hintergrund immer aktivierten Zellen durch die Aufreinigung überproportional

gemessen werden. So ist auch eine Darstellung der FACS-Ergebnisse einer scheinimmunisierten Maus keine aussagekräftige Kontrolle, weil es auch hier zu einer Aufreinigung hintergrundaktivierter Zellen kommt (daher Daten hier nicht gezeigt).

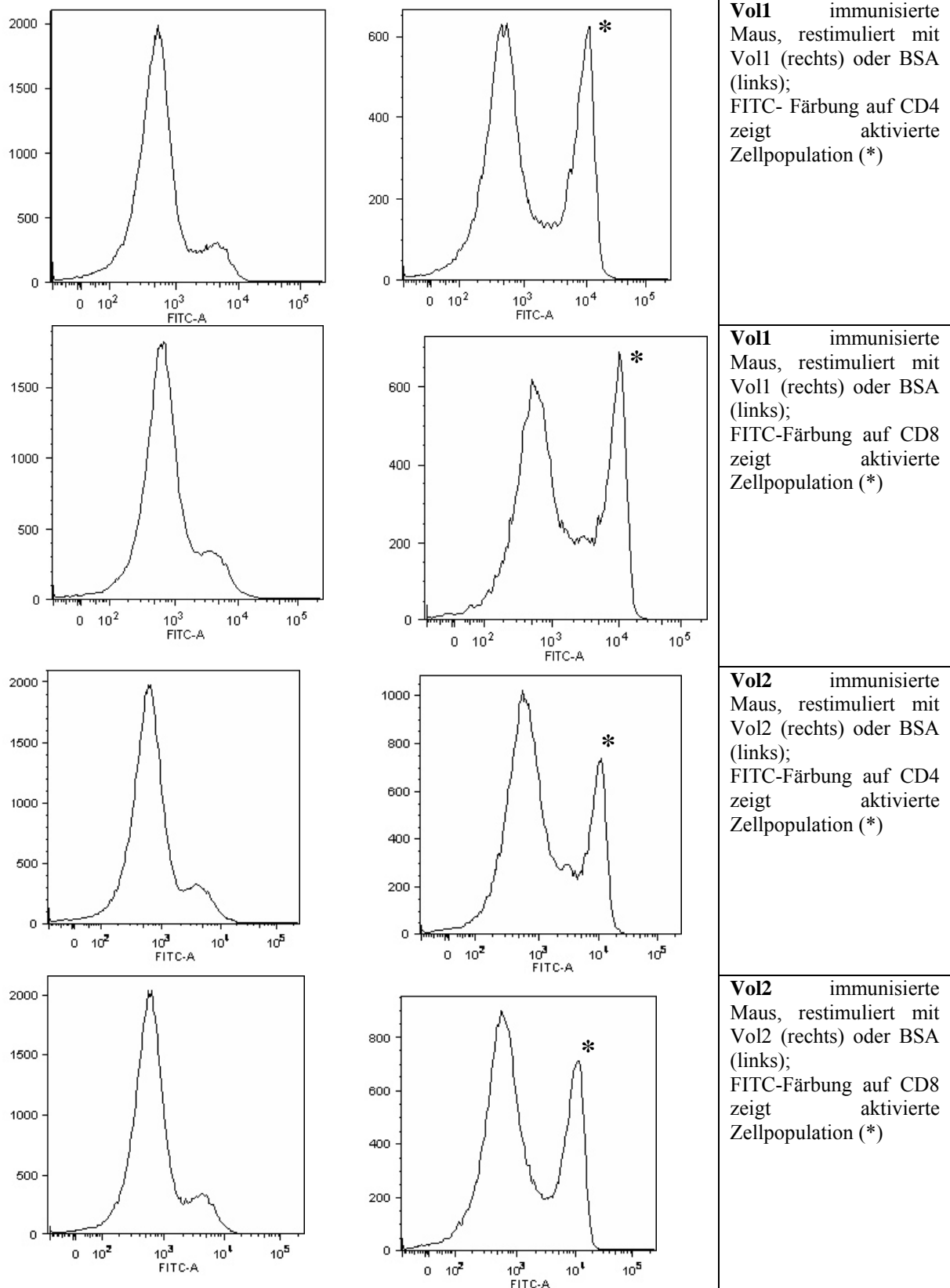


Abb. 45: Durchflusszytometrische Analyse der IFN- γ sezernierenden Zellen nach In-vitro-Restimulation mit dem jeweiligen Impfstoff Vol1 oder Vol2. Nachweis von CD4⁺ und CD8⁺ reaktiven Zellen.

5.3 Untersuchung der Immunantwort nach intramuskulärer Vakzinierung

5.3.1 Antikörper in Blut und Vaginallavage

Vor der Messung der AK-Titer wurden im ELISpot-Assay reaktive T-Zellen gemessen. Dabei zeigte sich, dass nach intramuskulärer Immunisierung mit MF59C eine im Western Blot detektierbare AK-Antwort gegen Vol1 und Vol2 hervorgerufen wurde (Daten hier nicht gezeigt). Zudem fand eine derart unspezifische Aktivierung von T-Zellen statt, dass ein sinnvoller Readout nicht möglich war. So wurde beschlossen, die weiteren Versuche zur Charakterisierung der Immunantwort nach i.m. Gabe einzustellen und sich auf die intranasale und T3SS-vermittelte Vakzinierung zu konzentrieren.

5.3.2 Zelluläre Immunantwort

Wie in C 5.3.1 erläutert, war die sinnvolle Messung der reaktiven T-Zellen bei den i.m. immunisierten Tieren nicht möglich, weshalb hier auf eine graphische Darstellung der Ergebnisse verzichtet wird.

Die immunisierten Mäuse zeigten unter allen gemessenen Bedingungen (Restimulation mit Puffer allein, BSA sowie den Impfstoffproteinen Vol1 und Vol2) eine maximale Anzahl aktivierter IFN- γ sezernierender T-Zellen. Offensichtlich war es nach i.m. Immunisierung mit MF59C durch das Adjuvans alleine schon zu einer solch drastischen unspezifischen T-Zellaktivierung gekommen, sodass eine spezifische Immunreaktion gegen die Impfstoffproteine nicht mehr detektierbar war.

C 6. Belastungsinfektion-Schutzwirkung

Nach der letzten Booster-Immunisierung am Tag 24 wurde an Tag 31 die Belastungsinfektion durchgeführt (Zeitpläne s. C 4). Es erfolgte eine intraperitoneale Injektion (s. B 2.6.8) von 3×10^6 KBE des ExPEC-Stammes CFT073, suspendiert in 200 μ l vorgewärmtem PBS. Um peritoneale Reizzustände durch zu hohe Last an LPS zu vermeiden, wurde die Infektionsdosis 2x in 2 ml eiskaltem PBS gewaschen und zwischenzeitlich für 3 min mit 5000 rpm pellettiert. Die Keimlast wurde durch Ausplattieren der Infektions-Dosis in Verdünnungsstufen nach jeder Infektion verifiziert. 48 h nach der Infektion wurden die infizierten Mäuse getötet, ihre Lebern und Milzen homogenisiert (B 2.6.11) sowie zur Bestimmung der bakteriellen Last Verdünnungsreihen der Gewebekomponenten auf MH-Platten ausplattiert.

6.1 Schutzwirkung nach intranasaler Vakzinierung

Die Schutzwirkung der Immunisierung wurde durch intraperitoneale Belastungsinfektion bestimmt. In der intranasal geimpften Gruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion der bakteriellen Last in der Leber bei den immunisierten gegenüber den scheinimmunisierten Mäusen (s. **Abb. 46**). Die Keimlast in der Milz (s. **Abb. 47**) war bei Impfgruppe Voll1 ebenfalls signifikant reduziert, bei Impfgruppe Vol2 hingegen war die Differenz wegen der geringen Gruppengröße nicht signifikant.

Bei den immunisierten Mäusen war nach 12 h bereits phänotypisch eine deutliche Protektion zu erkennen (s. **Abb. 48**) und sie zeigten schon nach 24 h keinerlei Krankheitszeichen wie struppiges Fell mehr. Die mock-immunisierten Tiere dagegen waren noch stark gezeichnet oder starben sogar an der Infektion (10-30%).

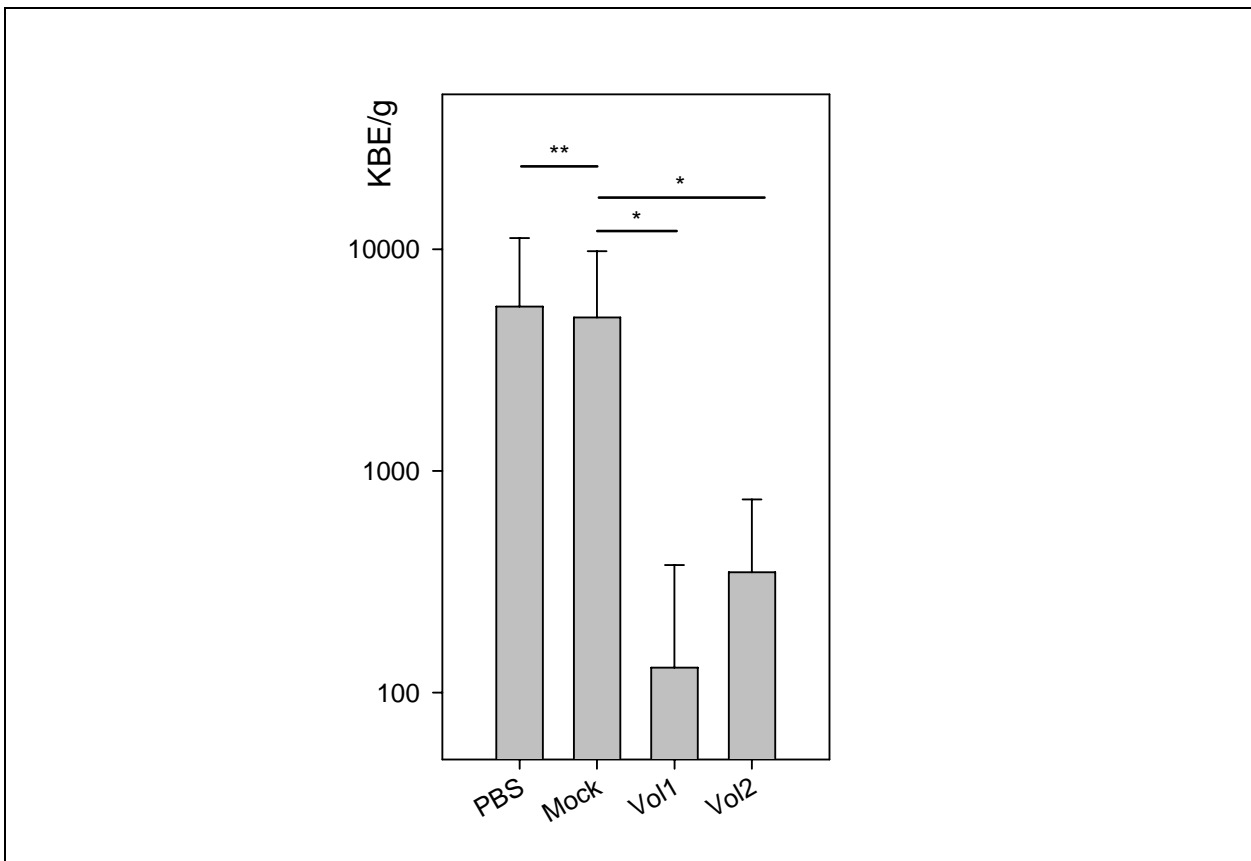


Abb. 46: Bestimmung der Schutzwirkung nach Erregerbelastungstest; KBE nach i.n. Tot- Immunisierung jeweils pro Gramm Organgewicht **Leber**. PBS und CT sind Kontrollgruppen, Vol1 und Vol2 die jeweils immunisierten Gruppen.

*: $p < 0,05$; signifikant; **: $p > 0,05$; nicht signifikant

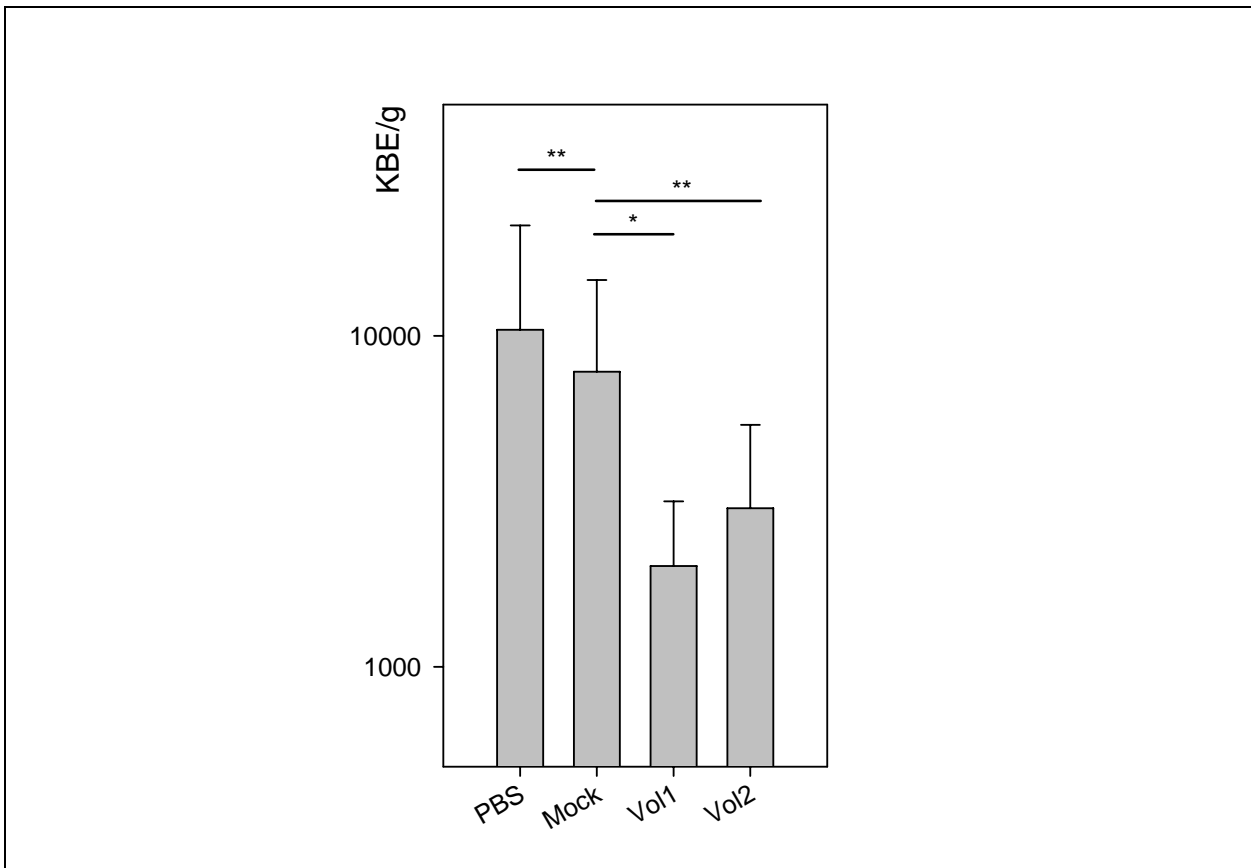


Abb. 47: Bestimmung der Schutzwirkung nach Belastungsinfektion; KBE nach **i.n.** Tot-Immunisierung jeweils pro Gramm Organgewicht **Milz**. PBS und CT sind Kontrollgruppen, Vol1 und Vol2 die jeweils immunisierten Gruppen.

*: $p < 0,05$; signifikant; ** $p > 0,05$; nicht signifikant



Abb. 48: Beispielhafte Fotografien der Versuchstiere bei Belastungsinfektion: Rechts Tiere der Kontrollgruppe, (intranasale Immunisierung mit CT und Proteinpuffer) 24 h nach i.p. Infektion mit EXPEC- Stamm CFT073 (3×10^6 KBE in 200 μ l). Man erkennt deutlich das struppige Fell und die durch leichte Peritonitis gekrümmte Körperhaltung sowie eine reduzierte Aktivität.

Links dagegen Versuchstiere der intranasal mit Vol2 immunisierten Gruppe: Man erkennt neben einer vollständig normalen Fellbeschaffenheit auch keine phänotypische Beeinträchtigung der Tiere.

6.2 Schutzwirkung nach T3SS-abhängiger Immunisierung

Die T3SS-abhängig immunisierten Mäuse wurden wie oben beschreiben ebenfalls einer Belastungsinfektion unterworfen und nach 48 h getötet. Alle Gruppen zeigten eine geringere Keimlast als die nur mit PBS immunisierte Kontrollgruppe. Es kam während der ersten 48 h zu keinen Todesfällen in den Schein- oder pST1/2-infizierten Gruppen. Ein gewisser Trend zur Protektion zeigt sich schon bei den mit SB824 alleine immunisierten Tieren. Darüber hinaus wies die Gruppe pST1 eine signifikante Protektion durch die Vakzinproteine auf (s. **Abb. 49** und **50**).

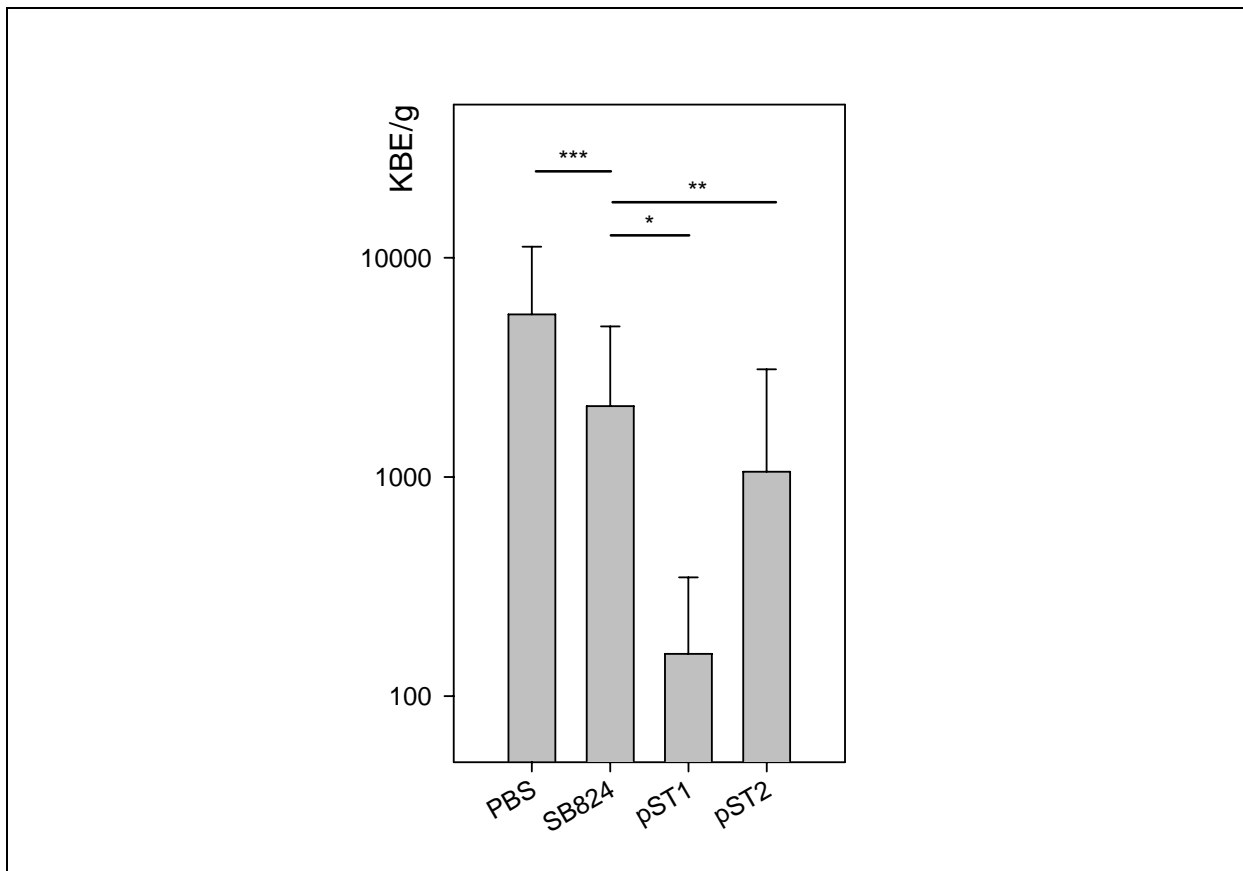


Abb. 49: Bestimmung der Schutzwirkung nach Belastungsinfektion; KBE nach T3SS-abhängiger Lebend-Immunisierung jeweils pro Gramm Organgewicht **Leber**. PBS und SB824 (*Salmonella* Typhimurium) sind Kontrollgruppen, pST1 und pST2 die jeweils immunisierten Gruppen (*Salmonella* Typhimurium mit Vakzin codierendem Plasmid).

*: $p < 0,05$; signifikant; **: $p > 0,05$; nicht signifikant; *** geringe Power durch kleine PBS Kontrollgruppe

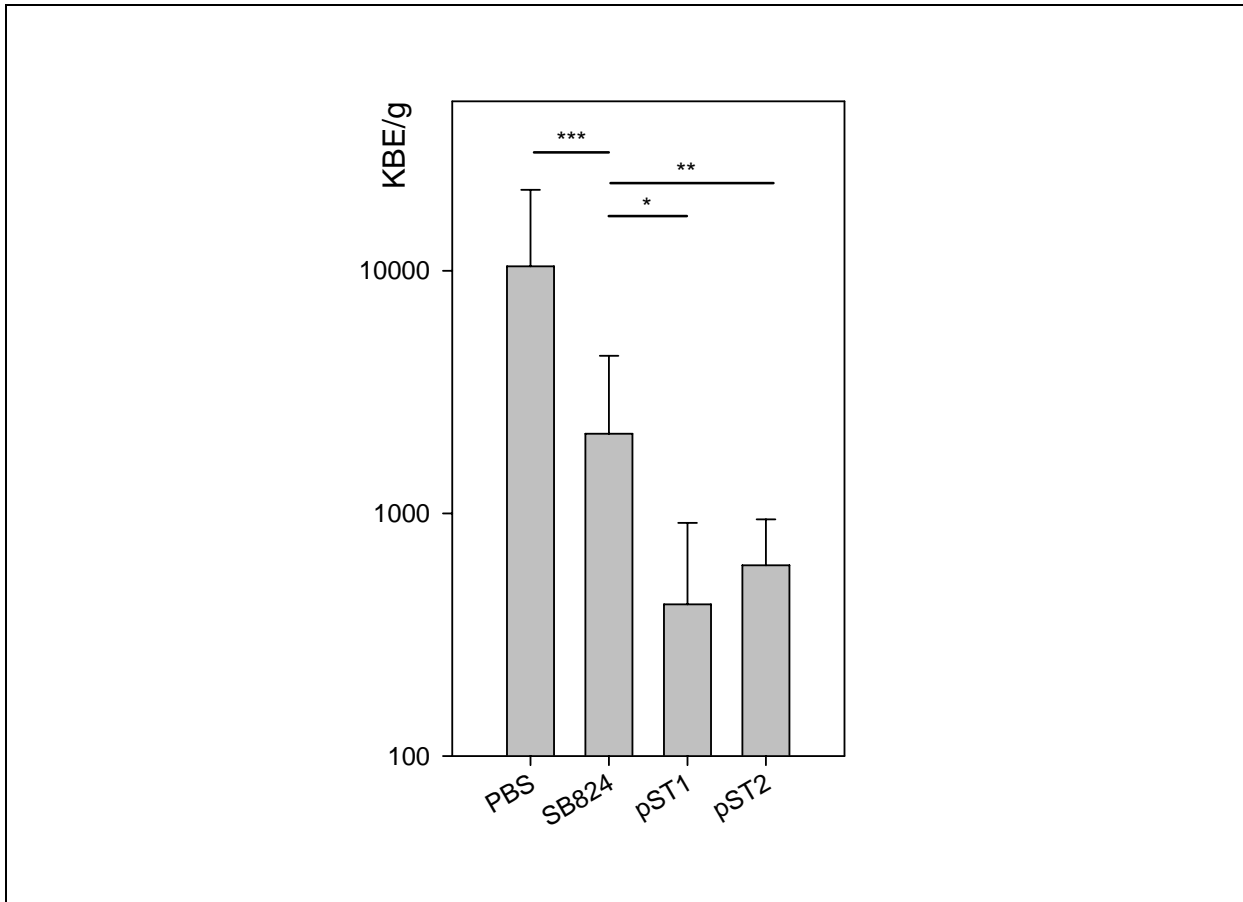


Abb. 50: Bestimmung der Schutzwirkung nach Belastungsinfektion; KBE nach T3SS-abhängiger Lebend-Immunisierung jeweils pro Gramm Organgewicht **Milz**. PBS und SB824 (*Salmonella Typhimurium*) sind Kontrollgruppen; pST1 und pST2 die jeweils immunisierten Gruppe.

*: $p < 0,05$; signifikant; **: $p > 0,05$; nicht signifikant; *** geringe Power durch kleine PBS Kontrollgruppe

D DISKUSSION

Impfungen sind eine kostengünstige und effiziente Methode der Prävention von Infektionskrankheiten. Viele früher weit verbreitete seuchenartige Krankheiten konnten damit zurückgedrängt (wie beispielsweise Polio) oder gar komplett ausgerottet werden (etwa die Pocken) (Hinman 1998). Stetig werden neue Impfstoffe entwickelt und durch neuartige verbesserte Herstellungsmöglichkeiten gezielter und nebenwirkungsärmer. Es gab in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Versuche, eine Impfung gegen Harnwegsinfekte, eine der häufigsten Infektionskrankheiten der westlichen Welt, zu entwickeln, bislang jedoch ohne Erfolg.

Ziel dieser Arbeit war die computergestützte Entwicklung eines Multi-Epitop-Impfstoffes gegen extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC). Dieses Vorhaben beinhaltete die Auswahl der Impfstoffstrukturen (antigenen Proteindomänen), Planung und Erstellung der notwendigen, dafür codierenden Gene sowie die Herstellung der rekombinanten Multi-Epitopproteine und die Entwicklung eines Lebendimpfstoffes. Ferner die Applikation im Mausmodell und das Überprüfen der Wirksamkeit anhand von Antikörper-Titern, T-Zell-Restimulations-Assays sowie Belastungsinfektionen.

Die Abwehr von Infektionen beim naiven Wirt beginnt überwiegend mit der unspezifischen Abwehr. Auch beim Harnwegsinfekt kommt es durch bakterielle Vermehrung und die dabei freigesetzten bakteriellen Stoffwechselprodukte schon bald zu einer Entzündungsreaktion. Es kommt zu einer Abschilferung der oberflächlichen Urothelzellschicht und Einwanderung von Phagozyten. Die lokale Abwehrreaktion gegen die Infektionserreger reicht jedoch meist nicht aus, um eine Abheilung der Infektion herbeizuführen. Erst eine Produktion von Immunglobulinen führt zur Elimination der im Urinfluss befindlichen Erreger. Sowohl lokal produzierte lösliche IgA-Antikörper, als auch als Transsudat freigesetzte IgG-Antikörper spielen eine neutralisierende oder opsonierende Rolle. Trotzdem kommt es vermutlich oft zu einer Persistenz von Erregern als kleine intrazelluläre Kolonien (QIR) in den Urothelzellen (Mysorekar 2006). Diese können durch AK nicht wirkungsvoll bekämpft werden. Hierzu wird vermutlich eine T-zelluläre Immunantwort benötigt.

Diese Arbeit beschreibt den ersten erfolgreichen Versuch eines *in silico* entworfenen kombinierten Multi-Epitop-Impfstoffes gegen ExPEC im Mausmodell.

Im Gegensatz zu früheren Versuchen, die entweder auf abgetötete Mischungen von verschiedenen *E. coli*-Stämmen (Uro-Vaxom[®] Schmidhammer 2002) oder einzelnen Virulenzfaktoren (FimH/C Vakzin Langermann et al. 2000; Langermann & Ballou 2001) oder Teilen davon (Durant et al. 2007) basierten, kommen hier erstmals in einem Protein aneinander gekettete Untereinheiten von Virulenzfaktoren als Multi-Epitop-Vakzin zum Einsatz. Außerdem wurde der postulierten (Jones-Carson et al. 1999, Roberts 1999, Thumbikat et al. 2006) Rolle von zellulärer Immunreaktion bei der Abwehr der Harnwegsinfekte erstmals Rechnung getragen und die Vakzine hinsichtlich der Entstehung einer T-Zell-Immunantwort geplant. Im Mausmodell wurde eine neuartige Vakzinierungsstrategie unter Einsatz attenuierter Salmonellen eingesetzt, die mittels Typ-III-Sekretion die Impfstoffproteine in das Zytoplasma der Wirtszellen, u.a. auch antigenpräsentierende Zellen, injizieren (s. **Abb. 22**). Dabei kam es zu keiner signifikanten Induktion von Antikörpern (s. **Abb. 30** ff. und **31** ff.), aber zu einer starken T-zellulären Antwort. Es waren dabei sowohl T-Helfer- als auch cytotoxische T-Zellen nachweisbar (s. **Abb. 37**). Bei dem zweiten im Tiermodell getesteten Verfahren, der intranasalen Immunisierung, kam es sowohl zu einer starken Induktion von T-zellulärer Antwort als auch einer starken Antikörperreaktion (s. **Abb. 38** ff. sowie **44** f.). Durch Belastungsinfektionen nach einem Monat Immunisierung gelang nach T3SS-abhängiger Vakzinierung mit Voll erstmals der Nachweis einer signifikanten Schutzwirkung durch T-Zellantwort ohne erhöhte Immunglobulin-Titer gegen einen Wildtyp ExPEC Stamm.

Es zeigte sich ebenfalls eine Schutzwirkung bei den intranasal immunisierten Tieren (s. **Abb. 46** f. und **50**). Die ursprünglich ebenfalls angedachte intramuskuläre Immunisierungsrouten wurde nach den ersten Vorversuchen abgebrochen. Durch Einsatz des außerordentlich potenten Adjuvans MF59C, bekannt aus dem Influenza-Impfstoff Flud[®], kam es zu einer außergewöhnlichen Stimulation des Immunsystems, auch ohne Zugabe eines Antigens, sodass eine sinnvolle Analyse speziell der T-Zellantworten nicht mehr möglich war. Außerdem sollte der Fokus der Arbeit auf neuen Impfstrategien liegen.

Die große Gruppe der ExPEC stellt für die Vakzineentwicklung eine besondere Herausforderung dar, da sie sehr heterogen ist und es keinen singulären Virulenzfaktor gibt, der als Impftarget benutzt werden könnte. Um Virulenz assoziierte Proteine zu identifizieren, wurden subtraktive Genanalysen durchgeführt. Zum Einsatz kamen dabei ExPEC-Stämme, die als Patientenisolate von Harnwegsinfekten, Urosepsis, Meningitis oder Peritonitis

gewonnen worden waren, ferner bekannte kommensale Stämme, die aus dem Stuhl gesunder Probanden isoliert wurden. Problematisch erscheint hier, dass eine Überprüfung hinsichtlich der potenziellen Pathogenität der Darmisolate schwierig ist da es dafür kein gutes Modell gibt. Zudem ist bekannt, dass das Reservoir der ExPEC-Stämme auch beim Gesunden im Darm liegt. Daher ist nicht auszuschließen, dass irrtümlich bei den als kommensal angesehenen Stämmen extraintestinal pathogene enthalten sind.

Bei den gewählten Impftargets bekannter Funktion, den Siderophorrezeptoren FyuA, ChuA, IutA, IreA sowie IroN und IhaA, Siderophorrezeptoren, die zusätzlich auch als Adhäsion/Invasin fungieren (Sorsa et al. 2004, Feldmann et al. 2007, Johnson et al. 2005), kann von einer strengen Virulenzassoziation ausgegangen werden (s. **Abb. 5**). Spezifität wurde ebenfalls für das Protein Usp (Nakano et al. 2001) mit noch unbekannter Funktion gezeigt (Kurazono et al. 2000).

Für die Siderophorrezeptoren konnte zwischenzeitlich von anderen Gruppen nachgewiesen werden, dass sie im Mausmodell auch im Infektionsablauf eine Rolle spielen und dabei in vivo exprimiert werden (Alteri & Mobley 2007, Reigstad et al. 2007)

Auch konnte bereits für IroN ein Teilschutz nach Vakzinierung mit dem Vollprotein gezeigt werden (Russo et al. 2003, Hildinger et al., unveröffentl.). Jedoch weisen nicht alle ExPEC-Stämme IroN als Target auf, sodass eine Immunisierung gegen nur ein Target immer lückenhaft bleiben muss.

Ziel dieser Arbeit war die Erstellung zweier Multi-Epitop-Vakzine, also zweier Proteine, die aus jeweils mehreren kurzen Fragmenten der oben genannten Impftargets zusammengesetzt sind. Um nach Immunisierung mit dem Multi-Epitop-Protein eine Antikörperantwort gegen die Vollängen-Virulenzfaktoren zu erhalten, sollten auf den jeweiligen kurzen Fragmenten MHC-II-Epitope in ausreichender Menge vorhanden sein. Da kurz vor Beginn dieser vorliegenden Arbeit bekannt wurde, dass ein wichtiger Zwischenschritt der Vermehrung der UPEC intrazellulär in den oberflächlichen Deckzellen des Urothels stattfindet (Justice et al. 2004), sollte auch die zelluläre Immunantwort (T-Zellen) gegen UPEC bei weiteren Versuchen, einen Impfstoff zu entwickeln, mit einbezogen werden. Auch konnte kürzlich gezeigt werden, dass spezifische T-Zell-Immunität gegen Ovalbumin eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Harnwegsinfekten durch Ovalbumin produzierende *E. coli* im Mausmodell spielt (Thumbikat et al. 2006). Schon lange sind intrazellulär persistierende *E. coli*-Kolonien als einer der Gründe für rekurrentes Auftreten von Harnwegsinfekten angenommen worden (Wiles et al. 2008). Die intrazellulären Stadien werden von Antikörpern nicht erreicht, sollten aber durch eine T-zelluläre Antwort bekämpft werden können. Deshalb wurden neben den

MHC-II- auch MHC-I-Epitope auf den jeweiligen kurzen Peptidsequenzen der Multi-Epitop-Proteine integriert.

Alle ausgewählten Impftargetproteine wurden mittels computergestützter Algorithmen untersucht, um mögliche MHC-I- und MHC-II-Epitope zu erkennen. Da sich jedoch die MHC-Moleküle in den Sequenzen, die sie bevorzugt binden, unterscheiden, und es eine Vielzahl verschiedenster MHC-Allele gibt, wurde in der vorliegenden Arbeit die Prädestination speziell auf das sehr gut charakterisierte Modellsystem der Balb/C Maus optimiert. Dies schränkt zwar die Einsatzmöglichkeiten des Impfstoffes möglicherweise ein, da Epitope, die vielleicht im Menschen protektiv wären, möglicherweise nicht erfasst werden. Jedoch scheint mit derzeitigem Wissensstand nur eine Anwendung in einem gut charakterisierten Modellsystem Erfolg versprechend, da die Bindeaffinitäten einer Vielzahl von humanen MHC-Rezeptoren noch nicht ausreichend charakterisiert sind. Die Balb/C-Maus weist als Inzuchtsamm nur noch die MHC-I-Allele *Kd*, *Dd* und *Ld* auf sowie die MHC-II-Allele *I-Ad* und *I-Ed* auf. Für die Prädiktion der MHC-I-Epitope wurde ebenfalls das Proteasomenschnittmuster berücksichtigt, da vor allem das C-terminale Ende der Epitope am Proteasom festgelegt wird, wohingegen der N-terminale Schnitt meist durch Trimmen im ER bestimmt wird (Del Val et al.; Theobald et al. 1998; Cascio et al. 2001). Benutzt wurde hauptsächlich das frei zugängliche Tool Rankpep (<http://bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP/>; Zitat s. B 2.2.3) der Harvard University (Boston, MA, USA), da dieses in Vergleichen exzellent abgeschnitten hat (z.B. Lin et al. 2008). Für die Prädiktion von Proteasomenschnittmustern wurde ebenfalls die Rankpep-Plattform sowie das frei zugängliche Tool NetChop benutzt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>) (Kesmir et al. 2002) das zwar auf humanen Proteasomdaten beruht, aber auch eine gute Treffgenauigkeit bei anderen mammalischen Schnittstellen hat.

Die ausgewählten Peptidsequenzen sollten für den Multi-Epitop-Impfstoff nicht nur viele der oben genannten passenden MHC-I- und -II-Epitope tragen, sondern auch für das Immunsystem exponiert sein. Deshalb wurde zusätzlich eine computergestützte Vorhersage der dreidimensionalen Struktur der Proteine durchgeführt. Trotz rascher Fortschritte in der Simulationstechnik und Ausnutzung mehrerer verschiedener Systeme wie TM BETA (s. B 2.2.1), PRED-TMBB, HMM-B2 TMR sowie Prof TMB ergaben teilweise widersprüchliche Ergebnisse. Die Struktur musste manuell nach besten Möglichkeiten aus den Ergebnissen der verschiedenen Algorithmen ausgewählt werden (s. Anhang). Die Genauigkeit wurde dabei anhand der kristallografisch dargestellten dreidimensionalen Struktur von FhuA und FepA überprüft. Es gibt bei der 3D- Simulation eine große Bandbreite an Ansätzen. Derzeit werden

die besten Ergebnisse mit lernenden Systemen auf Basis von neuronalen Netzen oder Hidden-Markov-Modellen erzielt. Letztere kamen hier zum Einsatz; sie weisen einen mehrdimensionalen, verdeckten Entscheidungsbaum auf, der verschiedene Aspekte der Proteinsequenz berücksichtigt und darauf basierend eine Strukturvorhersage trifft. Diese Systeme müssen ebenso wie neuronale Netze mit einer Datengrundlage an bekannten Struktur- und Sequenzdaten „trainiert“ werden. Am Ende entscheidet also nicht nur die Güte des Algorithmus, sondern auch die Menge an eingelesenen Daten über die Treffgenauigkeit der Vorhersagen. Ein besonderes Problem sind bei Strukturvorhersagen die hier benutzten bakteriellen Membranproteine, da es auf Grund der schlechten Kristallisierbarkeit leider kaum bekannte Strukturdaten gibt. Die in der vorliegenden Arbeit angewendeten Systeme sind daher speziell für bakterielle Membranproteine ausgelegt und mit den verfügbaren Daten trainiert worden. Außerdem zeigten sie im Vergleich mit den anderen Programmen eine gute Qualität der Vorhersagen, auch hier im Vergleich mit den bekannten Daten von FepA und FhuA (s. Anhang). Auf eine manuelle Editierung der gewonnenen Daten nach Durchsicht kann heute nach den Erfahrungen dieser Arbeit noch nicht verzichtet werden. Bei Untersuchung der Qualität eines solchen Vorhersagealgorithmus ist auch darauf zu achten, dass die als interne Qualitätssicherung eingesetzten Beispielproteine, deren Vorhersage möglichst nahe an der korrekten Struktur liegen soll, nicht bereits benutzt worden sind, um das System zu trainieren. In diesem Fall würden die Ergebnisse meist exakt den Strukturdaten entsprechen. Da keine Listen darüber zur Verfügung stehen, mit welchen bekannten Strukturdaten die Programme trainiert worden sind, muss demnach überprüft werden, ob die als interne Kontrolle benutzen Protein- und Strukturdaten überhaupt geeignet sind, d.h. im Ergebnis einem unbekanntem Protein entsprechen. Nach Vorhersage der Strukturen wurde also ausgeschlossen, dass die Algorithmen bereits mit den Struktur- und Sequenzdaten von FhuA oder FepA trainiert worden waren.

Die dreidimensionale Struktur der Zielproteine beim lebenden Bakterium könnte auch eine Reihe von diskontinuierlichen Konformationsepitopen aufweisen, die bei der Abwehr eines realen Infektes in vivo eine Rolle spielen. Diese, erst durch räumliche Faltung benachbarter Aminosäurereste entstehenden Epitope, sind aber einer Simulation anhand der Sequenz und auch der Struktur bislang überhaupt nicht zuverlässig zugänglich. Auch der Nachweis mittels Antikörperbindung an aufgereinigte Siderophorrezeptoren, mittels Immunoblot, erfasst nicht zuverlässig alle möglichen Epitope, da eine komplette Renaturierung bzw. Faltung eines komplexen Außenmembranproteins an der Nitrozellulose membran nur teilweise gelingt. Hinzu kommt, dass es außerordentlich unwahrscheinlich ist, dass die kurzen Epitop tragenden

Sequenzen, die hier eingesetzt werden sollten, in der Lage sind, eine Konformation einzunehmen, die in dreidimensionaler Struktur ein realistisches Konformationsepitop des Mutterproteins imitiert. Daher wurden Konformationsepitope in die Planungen dieses Impfstoffes nicht miteinbezogen.

Es gibt Untersuchungen, die zeigen konnten (Sette et al. 2002), dass allein die Anordnung der Epitop-Sequenzen in einem Multi-Epitop-Protein schon in der Lage ist, die letztendliche in vivo Immunogenität des einzelnen Epitops zu beeinflussen. Obwohl in der vorliegenden Arbeit auch versucht wurde, die Epitope durch erneute Computeranalyse im fertig zusammengestellten Multi-Epitop-Protein erneut zu bestätigen (s. **Abb. 8 u. 9**), ist doch eine sichere Aussage nicht möglich, da die zu Grunde liegenden Mechanismen nicht verstanden sind und daher auch nicht in die Simulationen Eingang finden können. Um so weit wie möglich Reihenfolgen- und Überlappungseffekte der Epitobereiche auszuschließen, wurden in der Arbeitsgruppe um Sette Spacer eingefügt (Sette et al 2002). Diese verhindern durch abwechselnde Glycin/Prolin-Sequenzen eine Bindung unerwünschter Sequenzen auf den MHC-Rezeptoren. Jedoch sind in praktisch allen Veröffentlichungen die Epitope von Multi-Epitop-Konstrukten entweder auf eine MHC-I- oder eine MHC-II-basierte Immunität ausgelegt. Im hier untersuchten Impfstoff jedoch sollte so gut wie möglich eine MHC-I- *und* MHC-II-Antwort ausgelöst werden. Hierzu gibt es in der Literatur nur unzureichende Daten. Es liegt nahe, dass bei einer Auswahl ausreichend langer epitophaltiger Sequenzen und Trennung mittels Spacer eine Prozessierung für beide Wege möglich ist. So konnte in dieser Arbeit nach intranasaler Immunisierung eine Antikörper- und CD4-Reaktion ebenso wie eine CD8-Reaktion gezeigt werden.

Es wurde vielfach gezeigt, dass eine spezifische Antikörperantwort gegen UPEC schützend wirken kann (Palaszynski et al. 1998 und andere). Dabei kann es sich sowohl um Serumantikörper (AK) der Subklasse G handeln, die durch Transsudation in den Urinstrom gelangen, als auch um submukosal produzierte AK der Klasse IgA. Dimeres IgA wird basal von Epithelzellen aufgenommen, durch die sekretorische Komponente ergänzt und apikal als sekretorisches sIgA transloziert. Dieser Vorgang findet nicht nur auf der Mukosa des Gastrointestinaltraktes, sondern auch an der Epithelgrenzschicht des Harnsystems statt. Lösliches sIgA stellt dabei vermutlich die wichtigste Antikörperklasse bei der Immunreaktion auf Harnwegsinfekte dar (Deo et al. 2004). Außerdem kehren antigenspezifische B-Zellen durch „Homing“-Mechanismen wieder an den Ort der Antigenpräsentation zurück, um dort

ihre AK, präferentiell dann der Subklasse IgA, zu produzieren. Dies gilt auch für in der Submukosa des Harntraktes aktivierte B-Zellen des Urogenitaltraktes (Macpherson et al. 2008). Die AK können im Harntrakt einerseits durch Bindung an bakterielle Außenproteine deren spezifische Anheftung am Urothel verhindern, andererseits auch die Erreger für eingewanderte Phagozyten opsonieren (nicht sIgA). Darüber hinaus können Serumantikörper in den Blutstrom übertretende Bakterien binden, neutralisieren oder opsonieren.

Um diese protektiven Effekte einer humoralen Immunantwort auf uropathogene Bakterien auszunutzen, sollte ein Impfstoff in der Lage sein, eine starke humorale Antwort (IgG, sIgA) hervorzurufen.

Nach intranasaler Immunisierung mit CT als Adjuvans, gelang in dieser Arbeit wie erwartet (Byun et al. 2001) ein starker Titeranstieg des Serum-IgG sowie des Vaginallavage-IgA gegen die Impfstoffproteine (s. **Abb. 38** ff.), der auch gegen die enthaltenen Vollängenproteine bzw. deren Peptide reaktiv war. Sehr auffallend ist dabei die starke Reaktion gegen IroN (s. **Abb. 42** und **43**). Da Antikörper gegen IroN potenziell protektiv sind (Russo et al. 2003; Hildinger & Schubert, unveröffentl.), kommt diesen eine besondere Bedeutung zu. Interessanterweise tritt sowohl nach Immunisierung mit Vol2, welches drei IroN Fragmente enthält, als auch mit Vol1 eine AK-Reaktion gegen IroN auf, obwohl Letzteres gar keine IroN Sequenzen enthält (s. **Tab. 7**). Das hoch immunogene IroN scheint dabei durch kreuzreagierende AK erkannt und gebunden zu werden. Durch diese Kreuzreaktivität kommt es auch bei den sensitiven Dot Blots zu einer schwachen Reaktion Vol1-immunisierter Mäuse gegen das Impfstoffprotein Vol2, umgekehrt jedoch kaum (s. **Abb. 42** und **43**). Es zeigt sich auch, dass die ausgewählten Epitopbereiche von Usp nur eine schwache Serum-IgG Antwort hervorrufen und die IgA Reaktion unterhalb der Nachweisgrenze lag. Bei Differenzierung zwischen den synthetischen Peptiden IutA1, -2 und -3 sowie IreA1 und -2 zeigte sich lediglich eine Reaktion gegen IutA2 und IreA1, die anderen Sequenzen enthielten offensichtlich trotz bioinformatisch vorhergesagter Epitope keine Sequenzen, die zu einer hinreichenden spezifischen AK-Produktion geführt haben.

So sind von den vermeintlichen fünf (s. **Tab. 7**) in Vol1 eingeschlossenen IutA MHC-II-Epitopen (drei auf IutA2 und zwei auf IutA1) mindestens zwei ohne Effekt auf die AK-Bildung in der Balb/C-Maus. Ähnlich sind bei IreA von den vier vorhergesagten in Vol2 enthaltenen Epitopen mindestens die zwei aus IreA2 und -3 höchstens schwache Antigene..

Bei der T3SS-abhängig immunisierten Gruppe konnte kein signifikanter Anstieg des Serum-IgG- oder Vaginallavage-IgA-Antikörpertiters gegen die Impfstoffproteine Vol1 oder Vol2 nachgewiesen werden (s. **Abb. 30** und **33**), obwohl die als Vehikel benutzten Salmonellen

über mehr als drei Wochen sowohl im Caecum (s. **Abb. 25**) als auch der Milz (s. **Abb. 24**) der Maus nachweisbar waren und über den gesamten Beobachtungszeitraum das Antigen codierende Plasmid aufwiesen (s. **Abb. 26 f.**).

Dies liegt vermutlich daran, dass es bei den benutzten Konstrukten hauptsächlich zu einer intrazytoplasmatischen Abgabe der Antigene (s. **Abb. 22**) kommt und dadurch nur eine schwache Stimulation der B-Zellen gegen die Vakzinproteine erfolgt (Konjufca et al. 2008).

Es ist jedoch wahrscheinlich, dass es im Laufe der Infektion auch zu einer Immunreaktion gegen den Salmonellenträgerstamm kommt. Da Salmonellen jedoch den *E. coli* sehr nahe verwandt sind, könnte es zur Erzeugung kreuzreaktiver, aber nicht gegen die Impfepitope gerichteter AK kommen. Um eine Stimulation von AK gegen die Vakzin-Targetproteine allein durch den Trägerstamm auszuschließen, wurde der Trägerstamm auf das Vorhandensein dieser Faktoren hin untersucht (s. **Abb. 19** und **Tab. 8**). Ferner wurden alle ELISA- und Restimulationsversuche immer gegen eine mit dem Salmonellenträgerstamm allein infizierte Gruppe verglichen. Bei der Belastungsinfektion zeigte sich schon eine Keimlastreduktion der mit dem Trägerstamm alleine infizierten Gruppe, verglichen mit der PBS-scheinimmunisierten Gruppe (s. **Abb. 48** und **49**). Bei den pST1- oder pST2-immunisierten Gruppen kam es zu einer weiteren Keimlastreduktion. Es kommt wie erwartet zu einer partiellen Protektion gegen eine *E. coli*-Infektion nach *Salmonella* Typhimurium-Infektion in der Maus. Dies äußerte sich sowohl durch eine erniedrigte Keimlast nach 48 h, sowie durch 100% Überlebensrate der mit Salmonellen infizierten Gruppen. Dies ist durchaus beachtlich, bedenkt man die Letalität von etwa 20 % bei der mit Puffer scheinimmunisierten Gruppe nach Belastungsinfektion. Die Immunantwort, die dem Schutz in diesem Falle zu Grunde liegt, entzieht sich den hier angewandten Analysen; sie ist nicht gegen die als Antigene genutzten Proteine gerichtet, da Reaktionen hier erfasst worden wären. Denkbar wäre eine Induktion von AK gegen Fimbrien, LPS oder andere Antigene, die Salmonellen und *E. coli* gleichermaßen tragen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es selbst unter Zuhilfenahme mehrerer guter momentan zur Verfügung stehender Softwaresysteme (s. B 2.2.1) und Nutzung eines der am besten charakterisierten Modellsysteme (Balb/c-Maus) noch nicht möglich ist, eine Ausbeute von mehr als der Hälfte an wirksamen Einzelepitopen zur AK-Induktion vorherzusagen. Wohlgedenkt schließt das noch nicht die tatsächliche biologische Schutzwirkung mit ein. Daher muss von einer relativ geringen Effektivität eines komplett computergestützten Vorgehens für ein Einzelepitop ausgegangen werden (Lin et al. 2008). Um Wirksamkeit zu

erreichen, ist offensichtlich die in diesem Modell gewählte große Anzahl an eingeschlossenen Epitopen Voraussetzung.

Prinzipiell wären in der Maus auch Reaktionen gegen das N-terminale 6xHis oder das C-terminale m45 tag möglich und könnten die Untersuchung der Immunantwort stören. Die Sequenzen der Tags wurden jedoch so gelegt, dass eine AK-Reaktion kaum stattfinden sollte. Bestätigt werden konnte dies wiederholt durch das bei Western Blots und ELISAs als Kontrolle mitgeführte Protein His-DHFR-m45, das sowohl N- als auch C-terminal sequenzidentisch mit den eingesetzten Impfstoffproteinen ist und lediglich statt der hoch immunogenen Vol1 oder Vol2 das mauseigene Protein der Dihydrofolatreduktase (DHFR) trägt. Sollte es also zu Reaktionen gegen die Tags gekommen sein, so müssten diese auch bei dem DHFR-Konstrukt auftreten. In der Tat war jedoch bei keiner Maus eine Steigerung des Titers dagegen festzustellen. In ähnlicher Weise gilt dies für die eingesetzten Vollängen Proteine, die ebenfalls zur Aufreinigung ein 6xHis tag tragen.

Wie oben beschrieben, wurde schon seit Jahren eine Schutzwirkung einer T-Zellantwort gegen UPEC postuliert (Jones-Carson et al. 1999; Roberts 1999; Thumbikat et al. 2006). Kürzlich konnte im Harnwegsinfektionsmodell der Maus mit einem Ovalbumin exprimierenden UPEC eine Schutzwirkung durch T-Zellantwort nachgewiesen werden (Thumbikat et al. 2006). Grundlage dafür ist vermutlich eine cytotoxische Wirkung von CD8 T-Zellen gegen infizierte Epithelzellen. Diese Wirkung könnte die Intrazelluläre Vermehrung und Persistenz von uropathogenen *E. coli* im Urogenitaltrakt beeinträchtigen (Justice et al. 2004). Deshalb wurde der in vorliegender Arbeit entwickelte Impfstoff auch auf die Stimulation einer T-zellulären Antwort hin überprüft. Es zeigte sich sowohl nach T3SS-vermittelter als auch nach intranasaler Immunisierung ein Anstieg der Frequenzen an reaktiven T-Zellen. In der Analyse im Durchflusszytometer konnte dokumentiert werden, dass es sich sowohl um CD4⁺- als auch CD8⁺-Zellen handelt. Die hierbei angewandte Technik der Aufreinigung aktivierter T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation (MACS) macht Kontrollen schwierig. Da es zu einer Ankonzentrierung von aktivierten und in diesem Falle IFN- γ sezernierenden Zellen kommt, kann bei allen Mäusen eine gewisse Menge an aktivierten CD4- und CD8-Zellen gemessen werden. D.h. lediglich die Kombination aus zwei Fakten, nämlich die Aussage einer gesteigerten Frequenz an IFN- γ sezernierenden Zellen im ELISpot *und* der Nachweis von CD4- und CD8-Zellen in dieser Population im FACS, ergeben zusammen die valide Aussage einer kombinierten und gesteigerten T-Zellantwort auf Restimulation mit dem Impfstoff. Aus diesem Grund sind auch in der

vorliegenden Arbeit die FACS-Daten von nicht immunisierten Kontrolltieren, die ja wie im ELISpot nachgewiesen, ausschließlich eine geringe T-Zell-Hintergrundaktivierung aufweisen, nicht dargestellt. Eine herkömmliche Analyse der gesamten Milzzellpopulation mittels FACS wurde aufgrund der doch geringen Frequenzen aktivierter Zellen nicht durchgeführt.

Nach intranasaler Vakzinierung (s. Booster-Schema) konnten Frequenzen von über 1000 reaktiven IFN- γ produzierenden Zellen pro 1 Mio. Milzzellen nachgewiesen werden. Inwiefern die T-Zellantwort alleine nach intranasaler Immunisierung eine Schutzwirkung entfaltet, konnte anhand der erhobenen Daten nicht direkt untersucht werden.

Jedoch kam es nach T3SS abhängiger Vakzinierung, wie oben beschrieben, zu keinerlei messbaren AK-Reaktion. In der ELISpot-Analyse zeigte sich jedoch eine T-Zellstimulation nach Vakzinierung. Bestätigt wurde dieser Befund durch Nachweis von IFN- γ sezernierenden CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen im FACS. Bei der Belastungsinfektion war trotz nicht detektierbarer AK-Antwort eine Schutzwirkung bei intraperitonealer Infektion nach Immunisierung mit Vol1 (s. **Abb. 48** und **49**) gegeben. Eine Schutzwirkung war nach Immunisierung mit Vol2 nicht signifikant, da die Gruppengröße nicht ausreichte. Dies legt eine Protektion durch T-Zellen vor allem bei der mit Vol1 immunisierten Gruppe nahe. Jedoch kam es nach Immunisierung mit Vol2 ebenfalls zu einem hochsignifikanten Anstieg der T-Zellen im ELISpot (s. **Abb. 36**). Es ist also davon auszugehen, dass nur wenige der *in silico* vorhergesagten T-Zellepitope auf den Proteinen Vol1 und Vol2 tatsächlich *in vivo* protektiv sind und auch die Anzahl der aktivierten T-Zellen kein verlässliches Maß für den Schutz darstellt. Durch qualitativ bessere Epitope scheint Vol1 effizienter zu sein als Vol2.

Ein ähnliches Bild ergibt sich nach i.n. Immunisierung. Zwar ist die Keimlastreduktion in der Leber der Mäuse (s. **Abb. 46**) bei Vol1 und Vol2 signifikant, in der Milz (s. **Abb. 47**) kann jedoch aufgrund der Gruppengrößen bei Vol2 keine Signifikanz gezeigt werden. Auch in diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass mit Vol1 eine bessere Wirkung als mit Vol2 erzielt wird. Generell kommt es nach i.n. Immunisierung mit dem Totimpfstoff zu einer stärkeren Keimlastreduktion als nach T3SS-Lebendimpfung.

Besonders interessant erscheinen schnell entwickelbare Impfstoffe, wie der hier dargestellte, für den Einsatz in der Human- und Tiermedizin. Vor allem da eine orale oder nasale Gabe bei Patienten oder Tieren leicht und sicher durchgeführt werden könnte. Auch ein weiteres Boostern mittels Nasenspray wäre schnell und einfach möglich, was vor allem in Hinblick auf die im Allgemeinen schnell fallenden IgA-Titer sehr vorteilhaft wäre.

Zu bedenken gilt allerdings, dass gerade die im Mausmodell so wirksamen Adjuvanzien, wie Cholera-toxin, für den humanmedizinischen Einsatz wegen noch unklarer Risiken durch direkt toxische Wirkungen in der Nasenschleimhaut und eventuell auch indirekt toxische Wirkungen nach retrogradem Transport ins Riechhirn, nicht eingesetzt werden können (Fujihashi et al. 2002). Daher müssten erst neue Adjuvanzien entwickelt und getestet werden. Weiterhin problematisch ist bei nasal und oral verabreichten Impfstoffen die schlechte Standardisierbarkeit der verabreichten Dosis verglichen mit parenteral verabreichten Präparaten. Selbst im Tierversuch, wo die intranasale Verabreichung unter Narkose stattfindet (s. B 2.6.2), ist nicht sicher zu sagen, ob ein Teil der Dosis nicht reflektorisch abgeschluckt wurde. Auch liegen keine sicheren Daten darüber vor, ob nicht beim Menschen mit dem Alter die Effizienz nasal verabreichter Impfstoffe durch geänderte Zusammensetzung der T- und B-Zellen herabgesetzt wird, wie es im Mausmodell gezeigt werden konnte (Fujihashi et al. 2002).

Tiermedizinisch relevant als Einsatzgebiet eines Impfstoffes sind vor allem Infektionen bei der Hühnerhaltung, etwa durch Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) (Ron 2006). Da sich die APEC- und ExPEC-Stämme im Bezug auf ihre Virulenzfaktoren sehr ähneln, wäre eine Impfung der Hühnerpopulationen wirtschaftlich interessant, auch im Hinblick auf sonst behandlungsbedingte Antibiotikabelastung des Tierbestandes. Dies führt einerseits zu einer Wertminderung der tierischen Erzeugnisse wie Fleisch oder Eiern und andererseits wird der Resistenzentwicklung Vorschub geleistet. Insbesondere Hühner sind durch Salmonelleninfektionen gefährdet und erhalten zurzeit einen attenuierten *Salmonella enterica* S. Thyphimurium-Stamm als Vakzine (AviPro SALMONELLA VAC TTM sowie Megan Vac 1TM; beide von *Lohmann Animal health*, Cuxhaven, Deutschland). Könnte wie bei dem hier beschriebenen System mittels attenuierter Salmonellen auch noch ein wirksamer Impfstoff gegen APEC appliziert werden, wäre dies ein Fortschritt. Es müsste jedoch untersucht werden, ob wegen der systembedingten geringen AK-Induktion (s. **Abb. 30** ff) es überhaupt zu einer additiven Schutzwirkung beim Huhn kommt. Dazu kommt weiter, dass die Auswahl der Epitope computergestützt erfolgte und auf die MHC-Bindestellen der Balb/C-Maus optimiert ist und nicht für das Huhn.

Ein Kritikpunkt, der sich gegen Impfstoffe auf Basis eines attenuierten bakteriellen Translokationssystems richtet, ist zum einen die mangelnde Sicherheit und Kontrollierbarkeit durch Immunität gegen den Trägerstamm, was eine erneute Benutzung des gleichen Stammes unmöglich oder zumindest weniger effektiv macht. Dies wäre vor allem beim Einsatz in der Humanmedizin kritisch, nicht jedoch in gleichem Maße beim tiermedizinischen Einsatz wie

etwa in der Hühnermasthaltung, da aufgrund kurzer Lebensspannen eine weitere Impfung nicht notwendig wäre. Zum anderen besteht die Tatsache, dass man bei der Impfung eine leichte systemische Infektion mit einem Mikroorganismus auslöst, was bei immunsupprimierten Patienten auch zu gesundheitlichen Schäden führen könnte.

Im Mausmodell konnte mittels Ciprofloxacin Therapie binnen 3 Tagen die „Impf-Infektion“ vollständig geklärt werden (auch im Caecuminhalt, s. **Abb. 24** und **25**). Ob dies jedoch so einfach auf den Menschen übertragen werden kann, ist fraglich. Wir konnten mit dem Salmonellen Mausmodell zeigen, dass eine frische Infektion selbst mit attenuierten Salmonellen nicht so einfach vollständig bis zur Keimfreiheit in Leber und Milz behandelt werden kann (Wieser et al. und Panthel, unveröffentl.).

Die hier vorgestellte Arbeit zeigt die Wirksamkeit eines Multi-Epitop-Impfstoffs gegen ExPEC im Mausmodell bei der akuten systemischen Infektion (i.p. Applikation). Dieses Modell lässt gute Rückschlüsse auf Schutz im Modell des akuten Harnwegsinfektes zu. Allerdings stellt die Entwicklung von transienten intrazellulären *E. coli* Ruhestadien (quiescent intracellular reservoir, QIR) vermutlich eine wichtige Rolle bei der Entstehung rekurrenter HWI dar (Mysorekar et al. 2006). Diese Dauerstadien stellen sich als äußerst resistent gegen antibiotische Behandlung dar und sind mit heutigen bekannten Therapien nicht behandelbar. Auch gibt es keine Daten aus den bisher durchgeführten Vakzinierungsstudien über mögliche Schutzeffekte gegen QIRs. Daher wäre herauszufinden, ob durch einen Impfstoff wie den hier vorgestellten, der in der Lage ist eine starke T-zelluläre Reaktion hervorzurufen, ein Schutz gegen die bestehenden oder im Rahmen einer Infektion neu gebildeten QIRs erzeugt wird.

Humanmedizinisch erstrebenswert ist eine einfach zu applizierende Vakzine für den Einsatz zur Prophylaxe, besonders bei sexuell aktiven Frauen und älteren Menschen. Dazu ist vor allem die leichte Applikation in Form eines Nasensprays sowohl für ein Zulassungsverfahren als auch für ein eventuell nötiges häufigeres Auffrischen sehr gut geeignet. Weitere Verbesserungen auf diesem Gebiet und Optimierungen weg vom Maussystem hin zum humanen System sollten angestrebt werden.

Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen APEC in der Geflügelzucht ist eine weitere interessante Anwendungsmöglichkeit der hier dargestellten Vakzinierungsstrategien. Die nächsten hierzu notwendigen Schritte werden bereits in einem laufenden Anschlussprojekt zusammen mit der Tierärztlichen Fakultät der LMU evaluiert. Besonderes Augenmerk liegt

dabei auf der Entwicklung großtechnisch durch Vernebelung applizierbarer Impfstoffe auf der Basis azellulärer selbst adjuvantierender Multi-epitop-Komplexe oder T3SS-abhängiger Lebendvakzine.

E ZUSAMMENFASSUNG:

Die extraintestinal pathogenen *Escherichia coli* (Pathotyp ExPEC) haben sich auf Infektionen außerhalb des Verdauungstraktes spezialisiert. Sehr häufig verursachen sie Harnwegsinfekte (man nennt solche Stämme uropathogene *E. coli*, UPEC) sowie bei aufsteigender Infektion Pyelonephritis und Urosepsis. Sie sind aber auch eine häufige Ursache für andere Infektionen wie Neugeborenen-Meningitis oder Peritonitis. Harnwegsinfekte stellen eine der häufigsten Infektionskrankheiten in den Industrieländern dar und verursachen neben hohen Behandlungskosten auch eine nicht unerhebliche Anzahl an Todesfällen.

Schon seit Jahren wurden Anstrengungen unternommen einen Impfstoff zu entwickeln, bislang jedoch ohne großen Erfolg. Die vorliegende Arbeit beschreibt eine neue Strategie ein neues Multi-Epitop-Vakzin gegen ExPEC zu entwickeln. Darüber hinaus wurde der Impfstoff im Mausmodell evaluiert.

Die für die Vakzineentwicklung benötigten Antigen-Targets wurden hauptsächlich durch computergestützte Verfahren identifiziert. Durch subtraktive Genomanalyse von pathogenen und apathogenen Stämmen wurde eine Reihe an virulenzassoziierten Proteinen identifiziert. Diese wurden nach Funktion (wenn bekannt) und Lokalisation unterschieden. Für die Vakzinentwicklung wurden letztendlich hauptsächlich Proteine der äußeren Membran von ExPEC die zur Eisenaufnahme und teilweise zusätzlich auch zur Adhäsion und Invasion genutzt werden ausgewählt, IutA, IhaA, FyuA, IreA, ChuA sowie IroN. Weiter wurde das Protein Usp miteinbezogen, welches möglicherweise ein sezerniertes Toxin darstellt und sehr pathogenspezifisch ist. Um für ein Multi-Epitop-Vakzin kurze antigentragende Sequenzen in den oben genannten virulenzassoziierten Proteinen zu finden, die auch noch an der Oberfläche exponiert sind, wurde eine computergestützte Strukturvorhersage sowie eine Prädestination von MHC-I- und MHC-II-Epitopen durchgeführt. Dabei wurden die bekannten Bindecharakteristika der MHC-Allele der als Modellsystem genutzten Balb/C-Maus berücksichtigt. Nach Identifikation der epitopreichen und exponierten Sequenzen wurden zwei neuartige Multi-Epitop-Proteine (Vol1 und Vol2) *in silico* konstruiert und unter Berücksichtigung des Codon-Bias der *Enterobacteriaceae*, der komplexen mRNA-Substrukturen und anderen Sequenzeigenschaften in DNA umgeschrieben. Diese zwei neuartigen Gensequenzen wurden mittels Gensynthese vollsynthetisch hergestellt, um einerseits Impfstoffprotein im *E. coli*-System herzustellen und aufzureinigen und andererseits in einem auf dem Typ-III-Sekretionssystem basierten Impfverfahren auf der Basis attenuierter lebender Salmonellen zu wirken. Nach Applikation der Impfstoffproteine Vol1 und Vol2

intranasal oder über das T3SS wurden die Mäuse auf spezifische Immunantwort untersucht. Serum IgG und mukosales IgA sowie spezifische CD4- und CD8 T-Zellen wurden bestimmt. Es konnte eine starke antigenspezifische Antikörper- und T-Zellantwort bei den intranasal immunisierten Tieren und lediglich eine T-Zellantwort bei den mit einem Lebendvakzin T3SS-abhängig immunisierten Tieren nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich durch die praktisch ausschließlich intrazytoplasmatische Injektion der Vakzinproteine bedingt. In der intraperitonealen Belastungsinfektion mit dem ExPEC-Stamm CFT073, zeigte die i.n. immunisierte Gruppe eine signifikante Protektion durch Verringerung der Keimlast in der Leber; in der Milz war der Schutz nur bei der Gruppe Voll1 signifikant. Nach T3SS-abhängiger Lebendimpfstoffapplikation zeigte sich bei der Voll1-Gruppe ebenfalls eine signifikante Protektion in der Leber. Zusätzlich fiel ein gewisser Schutz gegen die Belastungsinfektion nach Salmonellengabe auf, die unabhängig von den Impfstoffproteinen schon alleine durch die Infektion mit dem Salmonellenstamm SB824 auch in der Kontrollgruppe vermittelt wurde.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit ein neuartiger Multi-Epitop-Impfstoff bioinformatisch entworfen, rekombinant produziert und im Tiermodell getestet werden. Die ausgelöste Immunantwort wurde hinsichtlich klassenspezifischer Antikörperreaktion (IgG und mukosales IgA) gegen die Immunisierungsantigene untersucht. Ferner wurde die ausgelöste T-Zellantwort quantifiziert sowie differenziert nach CD4- und CD8-positiven spezifischen Zellen. Eine Protektion gegen intraperitoneale Infektion mit ExPEC konnte ebenfalls gezeigt werden.

F LITERATURVERZEICHNIS

- Aderem A. and Ulevitch R.J.** (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**: 782-787.
- Agace W.W., Hedges S.R., Ceska M., and Svanborg C.** (1993). Interleukin-8 and the neutrophil response to mucosal gram-negative infections. *J. Clin. Invest.* **92** (2): 780-785.
- Alteri C.J. and Mobley H.L.T.** (2007). Quantitative Profile of the Uropathogenic *Escherichia coli* Outer Membrane Proteome during Growth in Human Urine. *IAI* **75** (6): 2679-2688.
- Alteri C.J. and Mobley H.L.T.** (2009). Quantitative Profile of the Uropathogenic *Escherichia coli* Outer Membrane Proteome During Growth in Human Urine. *Infect. Immun.* **77** (3), 1272. This article corrects **Alteri, C.J. and Mobley, H.L.T.** (2007). Quantitative Profile of the Uropathogenic *Escherichia coli* Outer Membrane Proteome During Growth in Human Urine. *Infect. Immun.* **75**: 2679-2688.
- Baumann S., Nasser Eddine A. and Kaufmann S.H.** (2006). Progress in tuberculosis vaccine development. *Curr. Opin. Immunol.* **18** (4): 438-448.
- Bean M.A., Pees H., Fogh J.E., Grabstald H., and Oettgen H.F.** (1974). Cytotoxicity of lymphocytes from patients with cancer of the urinary bladder: Detection by A ³H-proline microcytotoxicity test. *Int. J. Cancer* **14**: 186-197.
- Birnboim H.C. and Doly J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Boes M., Stoppelenburg A.J., Sillé F.C.** (2009). Endosomal processing for antigen presentation mediated by CD1 and Class I major histocompatibility complex: roads to display or destruction. *Immunology* **127** (2):163-70
- Brauner A., Jacobson S.H. and Kühn, I.** (1992). Urinary *Escherichia coli* causing recurrent infections – a prospective follow-up of biochemical phenotypes. *Clin. Nephrol.* Dec, **38** (6): 318-323.
- Byun Y., Ohmura M., Fuhihashi K., Yamamoto S., McGhee J.R., Udaka S., Kiyono H., Takeda Y., Kohsaka T., and Yuki Y.** (2001). Nasal immunization with *E. coli* verotoxin 1 (VT 1)-B subunit of cholera toxin elicits serum neutralizing antibodies. *Vaccine* **19**: 2061-2070.
- Campos E.A., Namikoshi J., Maeba S., Yamamoto M., Fukumoto M., and Yamamoto H.** (2003). Nasally administered cholera toxin A-subunit acts as a mucosal adjuvant. *J. Oral. Sci.* **45** (1): 25-31.
- Cantey J.R.** (1985). Infectious diarrhea. Pathogenesis and risk factors. *Am. J. Med.* **78** (6B): 65-75.

Cascio P., Hilton C., Kisselev A.F., Rock K.L., and Goldberg A.L. (2001). 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* **20**: 2357-2366.

Cirl C., Wieser A., Yadav M., Duerr S., Schubert S., Fischer H., Stappert D., Wanita N., Wagner H., Svanborg C., Miethke T. (2008). Subversion of Toll-like receptor signalling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain containing proteins. *Nat Med.* 2008 Apr;14(4):399-406. Epub 2008 Mar 9.

Danna K.J. and Nathans D. (1971). Specific cleavage of Simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**: 2913-2917.

Del Val M., Schlicht H.J., Ruppert T., Reddehase M.J., and Koszinowski U.H. (1991). Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein. *Cell* **66** (6): 1145-1153.

Deo S.S. and Vaidya A.K. (2004). Elevated levels of secretory immunoglobulin A (sIgA) in urinary tract infections. *Indian J. Pediatr.* **71** (1): 37-40.

Domènech V.E., Panthel KI, Meinel K.M., and Russmann H. (2005). Rapid clearance of a recombinant *Salmonella* caccine carrier prevents enhanced antigen-specific CD8 T-cell responses after oral boost immunizations. *Microbes and Infection* **7**, 5-6: 860-866.

Dower W.J., Miller J.F. and Ragsdale C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by a high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145.

Durant L., Metais A., Soulama-Mouze C., Genevard J.M., Nassif X., and Escaich S. (2007). Identification of candidates for a subunit vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **75** (4): 1916-1925.

Elliott S.J., Srinavas S., Albert M.J., Alam K., Robins-Browne R.M., Gunzburg S.T., Mee B.J., and Chang B.J. (1998). Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. *Infect. Immun.* **66** (5): 2040-2051.

Feldmann F., Sorsa L.J., Hildinger K., and Schubert S. (2007). The Salmochelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in vitro. *Infect. Immun.* **75** (6): 3183-3187.

Fliedner M., Mehls O., Rautenberg E.W., and Ritz E. (1986). Urinary sIgA in children with urinary tract infection. *J. Pediatr.* **109** (3): 416-421.

Forrest B.D., LaBrooy J.T., Dearlove C.E., and Shearman D.J. (1992). Effect of parenteral immunization on the intestinal immune response to *Salmonella typhi* Ty21a. *Infect. Immun.* **60** (2): 465-471.

Fujihashi K., Koga T., van Ginkel F.W., Hagiwara Y., and McGhee J.R. (2002). A dilemma for mucosal vaccination: efficacy versus toxicity using enterotoxin-based adjuvants. *Vaccine* **20** (19-29): 2431-2438.

Galan J.E. and Wolf-Watz H. (2006). Protein delivery into eukariotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444** (7119): 567-573

Gruber A.R., Lorenz R., Bernhart S.H., Neuböck R., and Hofacker I.L. (2008). The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Res.* **36**: W70-W74.

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

Hautefort I., Thompson A., Eriksson-Ygberg S., Parker M.L., Lucchini S., Danino V., Bongaerts R.J.M., Ahmad N., Rhen M., and Hinton J.C.D. (2008). During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cell Microbiol.* **10** (4): 958-984.

Hinman A.R. (1998). Global progress in infectious disease control. *Vaccine* **16**: 1116-1121

Hochuli E. (1989). Genetically designed affinity chromatography using a novel metal chelate absorbent. *Biologically Active Molecules*: 217-239.

Hopkins W.J., Uehling D.T. and Balish E. (1987). Local and systemic antibody responses accompany spontaneous resolution of experimental cystitis in cynomolgus monkeys. *Infect. Immun.* **55** (9): 1951-1956.

Humphreys D., Hume P.J. and Koronakis V. (2009). The *Salmonella* Effector SptP Dephosphorylates Host AAA+ ATPase VCP to Promote Development of its Intracellular Replicative Niche. *Cell Host & Microbe*, **5** (3-3): 225-233.

Janknecht R., de Martynoff G., Lou J., Hipskind R.A., Nordheim A., and Stunnenberg H.G. (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 8972-8976.

Johnson J.R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **4** (1): 80-128.

Johnson J.R., Jelacic S., Schoening L.M., Clabots C., Shaikh N., Mobley H.L.T., and Tarr P.I. (2005). The Irg-A Homologue Adhesin Iha is an *Escherichia coli* Virulence Factor in Murine Urinary Tract Infection. *Infect Immun.* **73** (2): 965-971.

Jones-Carson J., Balish E. and Uehling D.T. (1999). Susceptibility of immunodeficient gene-knockout mice to urinary tract infection. *J. Urol.* **161**: 338-341.

Justice S.S., Hung C., Theriot J.A. Fletcher D.A., Anderson G.G., Footer M.J., and Hultgren S.J. (2004). Differentiation and development pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101** (5): 1333-1338.

Kaufman D.B., Katz R. and McIntosh R.M. (1970). Secretory IgA in urinary tract infections. *Br. Med. J.* **4** (5733): 463-465.

- Kelly T.J. Jr. and Smith H.O.** (1970). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*, II. *J. Mol. Biol.* **51** (2): 393-409.
- Kesmir C., Nussbaum A., Schild H., Detours V., and Brunak S.** (2002). Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. *Prot. Eng.* **15** (4): 287-296.
- Ko Y.C., Mukaida N., Ishiyama S., Tokue A., Kawai T., Matsushima K., and Kasahara T.** (1993). Elevated interleukin-8 levels in the urine of patients with urinary tract infections. *Infect. Immun.* **61** (4): 1307-1314.
- Konjufca V., Jenkins M., Wang S., Juarez-Rodriguez M.D., and Roy Curtiss III** (2008). Immunogenicity of Recombinant Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Vaccine Strains Carrying a Gene That Encodes *Eimeria tenella* Antigen SO7. *Infect. Immun.* **76** (12): 5745-53.
- Kucheria R., Dasgupta P., Sacks S.H., Khan M.S., and Sheerin N.S.** (2005). Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgrad. Med. J.* **81**: 83-86.
- Kurazono H., Yamamoto S., Nakano M., Nair G.B., Terai A., Chaicumpa W., and Hayashi H.** (2000). Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. *Microb. Pathog.* **28** (3): 183-189.
- Laemmli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Langermann S., Möllby R., Burlein J., Palaszynski S.R., Auguste C.G., DeFuso A., Strouse R., Schenerman M.A., Hultgren S.J., Pinkner J.S., Winberg J., Guldevall L., Söderhäll M., Ishikawa K., Normark S., and Koenig S.** (2000). Vaccination with FimH adhesin protects cynomolgus monkeys from colonization and infection by uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **181**: 774-778.
- Langermann S. and Ballou W.R. Jr.** (2001) Vaccination Utilizing the FimCH Complex as a Strategy to Prevent *Escherichia coli* Urinary Tract Infections. *J. Infect. Dis.* **183** (Suppl.1): 884-886.
- Lin H.H., Zhang G.L., Tongchusak S., Reinherz E.L., and Bruslic V.** (2008). Evaluation of MHC-II peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC Bioinformatics* **9** (Suppl.12): 522.
- Linn S. and Arber S.** (1968). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*, I. Purification and general properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **59**: 1300.
- Locher K., Rees B., Koebnik R., Mitschler A., Moulinier L., Rosenbush J. P., and Moras D.** (1998). Transmembrane signalling across ligand-gated FhuA-receptor: Crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **95**: 771-778.

- Lotter H., Russmann H., Heesemann J., and Tannich E.** (2004). Oral Vaccination with Recombinant *Yersinia enterocolitica* Expressing Hybrid Type III Proteins Protects Gerbils from Amebic Liver Abscess. *Infect. Immun.* **72** (12): 7318-7321.
- Macpherson A.J., McCoy K.D., Johansen F.E., and Brandtzaeg P.** (2008). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* **1**: 11-22.
- Masters J. R. W., Hepburn P.J., Walker L., Highman W.J., Trejdosiewicz L.K., Poverly S., Parkar M., Hill B.T., Riddle P.R., and Franks L.M.** (1986). Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Res.* **46** (7): 3630-3636.
- Matsueda S., Yamada A., Takao Y., Tamura M., Komatsu N., Yutani S., Ide T., Sata M., and Itoh K.** (2007). A new epitope peptide derived from hepatitis C virus 1b possessing the capacity to induce cytotoxic T-lymphocytes in HCV1b-infected patients with HLA-A 11, -A31, and -A33. *Cancer Immunol. immunother* **56** (9): 1359-1366.
- McBean M. and Rajamani S.** (2001). Increasing rates of hospitalization due to septicemia in the US elderly population, 1986-1997. *J. Infect. Dis.* **183**: 596-603.
- Meselson M. and Yuan R.** (1968). DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* **217**: 1110-1114.
- Mobley H.L., Green D.M., Trifillis A.L., Johnson D.E., Chippendale G.R., Lockett C.V., Jones B.D., and Warren J.W.** (1990). Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun.* **58** (5): 1281-1289.
- Mullis K.B, Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., and Erlich H.A.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Mulvey M.A., Schilling J.D., and Hultgren S.J.** (2001). Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect. Immun.* **69** (7), 4572-4579.
- Mysorekar I.U. and Hultgren S.J.** (2006). Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103** (38): 14170-14175.
- Nakano M., Yamamoto S., Terai A., Ogawa O., Makino S. I., Hayashi H., Balakrish Nair G., and Kurazono H.** (2001). Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS microbiology letters* **205** (1): 71-76.
- Neutra M.R. and Koslowski P.A.** (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature reviews. Immunology* **6** (2): 148-158.
- Orikasa S. and Hinman F. Jr.** (1977). Reaction of the vesical wall to bacterial penetration: resistance to attachment, desquamation, and leukocytic activity. *Invest. Urol.* **15** (3): 185-193.

- Palaszynski S., Pinkner J., Leath S., Barren P., Auguste C.G., Burlein J., Hultgren S., and Langermann S.** (1998). Systemic immunization with conserved pilus-associated adhesins protects against mucosal infections. *Dev. Biol. Stand.* **92**: 117-122.
- Porath J., Carlsson J., Olsson I., and Belfrage G.** (1975): Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599.
- Ramirez M.C. and Sigal L.J.** (2004). The multiple roads of MHC-I cross-presentation. *Trends in Microbiology* **12** (5): 204-207.
- Reche P.A, Glutting J.P and Reinherz E.L.** (2002). Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs. *Human Immunology* **63**: 701-709.
- Reigstad C.S., Hultgren S.J., and Gordon J.I.** (2007). Functional Genomic Studies of Uropathogenic *Escherichia coli* and Host Urothelial Cells when Intracellular Bacterial Communities are Assembled. *J. of Biological Chemistry* **282** (7): 21259-21267.
- Roberts J.A.** (1999). Unconventional immunology and urinary tract infection. *J. Urol.*: **161** (1), 3.
- Roberts R.J.** (2005). How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102** (17): 5905-5908.
- Rock K.L., Gamble S., Rothstein L.** (1990). Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* **249** (4971): 918-921.
- Rodgers L., Gamez A., Riek R., Ghosh P.** (2008). The type III secretion chaperone SycE promotes a localized disorder-to-order transition in the natively unfolded effector YopE. *J Biol Chem.* 2008 Jul 25;283(30):20857-63. Epub 2008 May 23
- Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K.** (1996). *Immunology*. 4th ed. Gower Medical Publishing Ltd. London.
- Ron E.Z.,** (2006). Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Current Opinion in Microbiology* **9**: 28-32.
- Russmann H., Shams H., Poblete F., Fu Y., Galan J.E., Donis R.O.** (1998). Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development. *Science* **281**: 565-568.
- Russmann H.** (2003). Bacterial type III translocation: a unique mechanism for cytosolic display of heterologous antigens by attenuated *Salmonella*. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**: 107-112.
- Russo T.A. and Johnson J.R.** (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* **5**: 449-456.

- Russo T.A., McFadden C.D., Carlino-MacDonald U.B., Beanan J.M., Olson R., and Wilding G.E.** (2003). The Siderophore Receptor IronN of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Is a Potential Vaccine Candidate. *IAI* **71** (12): 7164-7169.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sanger F., Air G.M., Barrell B.G., Brown N.L., Coulson A.R., Fiddes C.A., Hutchison C.A., Slocombe G.M., and Smith M.** (1977). Nucleotide Sequence of Bacteriophage Φ X174 DNA. *Nature* **265** (5596): 687-695.
- Saric T., Chang S.C., Hattori A., York I.A., Markant S., Rock K.L., Tsujimoto M., and Goldberg A.L.** (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nature immunol.* **3** (12): 1121-1122.
- Scaglione F., Mouton J.W., Mattina R., and Frascini F.** (2003). Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin in a murine pneumonia model: peak concentration/MIC versus area under the curve/MIC ratios. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47** (9): 2749-2755.
- Schilling J.D., Lorenz R.G., and Hultgren S.J.** (2002). Effect of trimethoprim-sulfamethoxazole on recurrent bacteriuria and bacterial persistence in mice infected with uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **70** (12): 7042-7049.
- Schmidhammer S., Ramoner R., Hörtl L., Bartsch G., Thurnher M., and Zelle-Rieser C.** (2002). An *Escherichia coli*-based oral vaccine against urinary tract infections potently activates human dendritic cells. *Urology* **60**: 521-526.
- Sette A., Newman M., Livingston B., McKinney D., Sidney J., Ishioka G., Tangri S., Alexander J., Fikes J., Chesnut R.** (2002). Optimizing vaccine design for cellular processing, MHC binding and TCR recognition. *Tissue Antigens* **59** (6), 443-451.
- Smith H.O. and Wilcox K.W.** (1970). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*, I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* **51**: 379-391.
- Sorsa, L.J., Dufke S. and Schubert S.** (2004). Identification of novel virulence-associated loci in uropathogenic *Escherichia coli* by suppression subtractive hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.* **230**: 203-208.
- Theobald M., Ruppert T., Kuckelkorn U., Hernandez J., Häussler A., Ferreira E.A., Liewer U., Biggs J., Levine A.J., Huber C., Koszinowski U.H., Kloetzel P.M., and Sherman L.A.** (1998). The sequence alteration associated with a mutational hotspot in p53 protects cells from lysis by cytotoxic T. lymphocytes specific for a flanking peptide epitope. *J. Exp. Med.* **188** (6): 1017-1028.
- Thumbikat P., Walterbaugh C., Schaeffer A.J., and Klumpp D.J.** (2006). Antigen-Specific Responses Accelerate Bacterial Clearance in the Bladder. *J. Immunol.* **176**: 3080-3086.

Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. **76**: 4350-4354.

Uehling D.T. and Steihm E.R. (1971). Elevated Urinary Secretory IgA in Children with Urinary Tract Infection. Pediatrics **47**: 40-46.

Wang R.F. and Kushner S.R. (1991). Construction versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. Gene **100**: 195-199.

Wieser A. and Schubert S. (2008). Multiepitope Vaccine against Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*(ExPEC). Nova Acta Leopoldina NF 98 (359): 105-109.

Wiles T.J., Kulesus R.R., Mulvey M.A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Exp. Mol. Pathol. **85**: 11-19.

G ABKÜRZUNGEN

| | |
|---------------------------------------|---|
| A | Ampere (Einheit der elektrischen Stromstärke) |
| AS | Aminosäuren |
| AA/BA | Acrylamid/ Bisacrylamid |
| AHT | Anhydrotetracyclin |
| AK | Antikörper |
| Amp | Ampicillin |
| Ampuwa | hochreines Wasser |
| AP | alkalische Phosphatase |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| A _{dest} / A _{bide} | destilliertes / doppelt destilliertes Wasser |
| AraC | Arabinosid C |
| AU | arbitrary units |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovine serum albumin (Rinder-Serum-Albumin) |
| B16-F10 | Mausmelanomzelllinie |
| Ca | Calcium |
| CFU | colony-forming units, s. auch KBE |
| Cip | Ciprofloxacinhydrochlorid |
| Cm | Chloramphenicol |
| ConA | ConcanavalinA |
| CT | Choleratoxin |
| Da | Dalton |
| DAPI | 4'-6-Diamidino-2-phenylindol |
| DABCO | 1,4-Diazobicyclo-(2.2.2.)-octan |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| dGTP | Desoxyguanintriphosphat |
| DHFR | Dehydrofolat-Reduktase |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |

| | |
|-------------------------------|--|
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) |
| DPBS | Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS ohne Ca ²⁺ -Ionen) |
| dTTP | Desoxytyrosintriphosphat |
| ECL | enhanced chemoluminescence (verstärkte Chemolumineszenz) |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| ELISA | enzyme-linked immuno sorbent assay (heterogener Enzym-Immuno-Assay) |
| ELISpot | enzyme-linked immuno spot |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| F | Farad (Einheit der elektrischen Kapazität) |
| FACS | fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie, geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson) |
| FKS | fetales Kälberserum |
| FITC | Fluorescein-isothiocyanat |
| g | Gramm; bei Zentrifugen die Erdbeschleunigung |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| Gm | Gentamicin |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde |
| HCl | Hydrogenchlorid (Salzsäure) |
| HCV 29 | immortalisierte humane Urothelzelllinie |
| HLA | human leukocyte antigen (humane Leukozytenantigene) |
| HPLC | high pressure liquid chromatography (Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie) |
| HRPO | horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase) |
| H ₂ O ₂ | Dihydrogendioxid (Wasserstoffperoxid) |
| IFN | Interferon |
| IgA, IgG, IgM | Immunglobuline A, G, M |
| IPTG | Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid |
| i.m. | intramuskulär |
| i.n. | intranasal |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| k | Kilo- (10 ³) |

| | |
|----------------------------------|---|
| KBE | Kolonie bildende Einheit |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KG | Körpergewicht |
| Km | Kanamycin |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertani (Nährmedium) |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LMW | low molecular weight |
| m | Milli- (10^{-3}) |
| M | molar |
| Mab | monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody) |
| MACS | magnetic cell separation |
| MALDI-TOF | Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisations- Massenspektroskopie |
| M45 | Maushybridomazelllinie |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| MH | Müller-Hinton (Nährmedium) |
| MHC | major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex) |
| min | Minute |
| μ | Mikro- (10^{-6}) |
| MOI | multiplicity of infection |
| mRNA | Messenger- oder Boten-Ribonukleinsäure |
| n | Nano- (10^{-9}) |
| NaCl | Natriumchlorid |
| Na ₂ CO ₃ | Natriumcarbonat |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat |
| NaH ₂ PO ₄ | Natriumdihydrogenphosphat |
| NaN ₃ | Natriumtrinitrid (Natriumazid) |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NH ₄ Cl | Ammoniumchlorid |
| NiNTA | Nickel-Nitrilotriacetic Acid (Nickel-Nitrilotriessigsäure) |
| OD ₆₀₀ | optische Dichte bei der Wellenlänge 600nm |
| Ohm | Einheit des elektrischen Widerstands |

| | |
|----------|---|
| PAGE | Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese |
| PBS | phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung) |
| PCR | polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion) |
| Pen | Penicillin |
| pH | pH-Wert, Potenz der Wasserstoffionenkonzentration |
| PI | Propidiumiodid |
| p | Piko- (10^{-12}) |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| pNPP | p-Nitrophenylphosphat |
| REV | Restriktionsenzym-“Verdau” |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RPMI | Zell-Nährmedium (nach dem “Roswell Park Memorial Institute”) |
| RT | Raumtemperatur |
| s.c. | subcutan |
| SDS | sodium-dodecyl-sulfate (Natriumdoceylsulfat) |
| sIgA | lösliches IgA, Dimer aus zwei IgA-Monomeren mit J-Kette und sekretorischer Komponente |
| SOC | Bakteriennährmedium |
| Strep | Streptomycin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA (Puffer) |
| TBS | Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung) |
| TBS-T | Tris-buffered saline tween (Tris-gepufferte Salzlösung + Tween 20) |
| TCA | Trichloressigsäure |
| T3SS | Typ-III-Sekretionssystem |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |
| TM | melting temperature (Schmelztemperatur) |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TRITC | Tetramethylrhodamin-isothiocyanat |
| Tween 20 | Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaureat |
| ü.N. | über Nacht |
| U | units (Einheiten) |
| UV-Licht | ultraviolettes Licht |
| V | Volt (Einheit der elektrischen Spannung) |
| VLE RPMI | very low endotoxin RPMI |

| | |
|-----|--|
| v/v | Volumen Komponente / Volumen Lösungsmittel |
| w/v | Masse Komponente / Volumen Lösungsmittel |
| WT | Wildtyp |
| Yop | <i>Yersinia</i> outer protein |

DANKSAGUNG

Zu allererst gilt mein tiefer aufrichtiger Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann und Herrn PD Dr. Sören Schubert für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die Aufnahme in das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe). Weiterhin besonders bedanken möchte ich mich bei oben Genannten für unzählige freundliche, hilfreiche Gespräche sowie die Freiheit, die ich in der Bearbeitung meines Themas genossen habe.

Speziell erwähnen möchte ich außerdem meinen Dank:

noch einmal an PD. Dr. Sören Schubert, der meinen Entschluss die Mikrobiologie als ärztliche Laufbahn einzuschlagen maßgeblich mit beeinflusst hat, für die vielen Diskussionen, die Unterstützung und unvergessliche Kongressreisen.

an Prof. Dr. Holger Rüssmann für die Überlassung der SB824 Salmonellen und der Backbones der Salmonellen Vektoren.

an Dr. Klaus Panthel für die vielen fachlichen und philosophischen Diskussionen und die unabdingbaren Maus-Feeding-Needles.

an Dr. Nikolaus Ackermann für die vielen ernsthaften und spaßigen Diskussionen.

an meine Eltern, die mich wegen dauerhafter Laborarbeit jahrelang praktisch nicht mehr zu Gesicht bekamen.

Zu aller Letzt möchte ich aber nicht vergessen, noch all den anderen hilfsbereiten Mitarbeitern des Max von Pettenkofer-Institutes zu danken, die für die außerordentlich angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Dazu gehören unter anderem Dr. Gottfried Wilharm, Xaver Sewald, Brigitte Koehn, Christoph Guggenberger, Beate Czech, Hicham Bouabe und natürlich alle Mitglieder im Team der AG Schubert, Kirsten Weinert, Giuseppe Magistro, Eva Romann, Christiane Hoffmann, Dr. Orsolya Benedek, Friederike Feldmann und PD Dr. Sören Schubert.

LEBENS LAUF

Andreas Wieser

Geb. 27.02.1983 in München, Deutschland

Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene
 und Medizinische Mikrobiologie
 Lehrstuhl Bakteriologie
 Ludwig-Maximilian-Universität (LMU) München
 Marchioninstr. 17
 81377 München
 Tel. +49 89 2180 78 296
wieser@mvp.uni-muenchen.de



Meilensteine in Studium und Forschung:

- 2009 **Arbeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Assistenzarzt** am Max von Pettenkofer-Institut für Mikrobiologie und Hygiene (LMU), Lehrstuhl Bakteriologie, AG EXPEC bei PD Dr. Sören Schubert
Forschungsaufenthalt an der **Universität Umea**, Schweden, bei Prof. Sun Nyunt Wai und Prof. Bernt-Eric Uhlin
Abschluss des Studiums der Humanmedizin an der Ludwigs-Maximilians-Universität (LMU), München/Deutschland mit „sehr gut“
- 2008 **Tertiale des Praktischen Jahres:**
 - Klinische Anästhesiologie und Intensivmedizin am Klinikum Großhadern (LMU)
 - Innere Medizin am Mt. Auburn und Mass. General Hospital (**Harvard Medical School, HMS**, Boston, MA/USA)
 - Chirurgie an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik (LMU)
- 2007 **Forschung** am Heart and Stroke/Richard Lewar Centre of Excellence in Cardiovascular Research an der **University of Toronto**, Ontario/Canada
- 2005-2009 Experimentelle **Promotionsarbeit** in der Mikrobiologie am Max von Pettenkofer-Institut, LMU; Thema: „Entwicklung einer Multi-Epitop-Vakzine auf Basis exponierter Peptidomänen verschiedener Virulenz-assoziiierter Außenmembranproteine uropathogener *Escherichia coli*“
- 2005 **Famulatur** in der Molekularen Diagnostik des Max von Pettenkofer-Instituts (LMU), PD Dr. med. Sören Schubert
- 2005 **Famulatur** am Campus Benjamin Franklin, **Charité Berlin**, Anästhesie und intraoperative Intensivmedizin, Prof. Dr. med. Michael Schäfer
- 2004 **Physikum** (erstes Staatsexamen nach neuer Äappo mit “sehr gut“)
- 2003 **Krankenpflegepraktikum**, Chirurgie und Innere Medizin, Prof. Dr. Kurt Ranft, Dr. Lothar Bartusch, Krankenhaus Penzberg
- 2002 **Abitur** am Gymnasium Penzberg/Oberbayern (1,00)
Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU

2001 **Biochemisches und Molekularbiologisches Praktikum bei Roche Diagnostics** in Penzberg

Preise/Stipendien:

- 2008 Stipendium der *Harvard-Munich Alliance for Medical Education* für das Praktische Jahr an der Harvard Medical School HMS (Boston, Mass./USA)
- 2007 Ausgewählt zur Teilnahme am *57th Meeting of the Noble Laureates 2007* in Lindau/Deutschland als einer von ca. 500 jungen Forschern aus aller Welt
- 2006-2007 *FöFoLe(V)-Förderprogramm für Forschung und Lehre* der medizinischen Fakultät als eines von 34 Mitgliedern
- 2005-2009 Stipendiat der *Studienstiftung des deutschen Volkes*
- 2002-2008 Stipendiat nach dem *Bayerischen Begabtenförderungsgesetz (BayBFG)*; Einladung zur *Maximilianeums-Prüfung* des bayerischen Staatsministeriums für Wissenschaft, Forschung und Kunst nach mit „sehr gut“ bestandener Begabtenprüfung beim Ministerialbeauftragten; (aber laut Statuten werden Studierende der Humanmedizin nicht in diesem Rahmen gefördert.)
- 2002 Verleihung des *Jugendpreises für Mikroelektronik 2002* der Universität Erlangen und IHK Nürnberg für die komplette Eigenentwicklung eines autonomen Roboters mit Ultraschallortungssystem im Rahmen der Facharbeit in Physik
- Karl-von-Frisch-Abiturienten-Preis* des Verbandes Deutscher Biologen und biowissenschaftlicher Fachgesellschaften, Aufnahme in den VdBiol
- Buchpreis 2002 der Deutschen Physikalischen Gesellschaft* DPG, Mitgliedschaft in der DPG
- e-fellows.net-Stipendium*
- 2001 *Förderpreis des Rotary-Clubs Penzberg* für *außergewöhnliches gesellschaftliches Engagement* als Mitglied der AG Schulbiotop
- Teilnahme am *Ferienseminar für vielseitig begabte und interessierte Gymnasiasten* in Hohenschwangau als einer von acht pro Regierungsbezirk Vom Ministerialbeauftragten ausgewählten Schülern
- 2000 Auszeichnung für außergewöhnliches *Engagement für das Gymnasium* (AG Schulgarten, AG Schülerzeitung, AG Alternative Energien, AG Astronomie, AG Schulbiotop)

Ehrenamtliche Tätigkeit:

- 2002 – jetzt Mitglied der Arbeitsgemeinschaft *Biotop* in Penzberg/Deutschland
- 2003 - 2008 Gründungs- und Vorstandsmitglied, seit 2009 nur Mitglied der *Sternwarte Penzberg e.V.*

Publikationen im Rahmen der vorliegenden Arbeit:

Originalpublikationen:

- 1 **Wieser A**, Romann E., Magistro G., Hoffmann C., Nörenberg D., Weinert K., Schubert S.
First Type-III secretion system based multi-epitope subunit vaccine against extraintestinal pathogenic Escherichia coli; **International Journal of Medical Microbiology** (submitted 2010)
- 2 **Wieser A.**, Romann E., Magistro G., Hoffmann C., Nörenberg D., Weinert K., Schubert S.
A multi-epitope subunit vaccine conveys protection against extraintestinal pathogenic Escherichia coli in mice; **Infection and Immunity** (accepted, May 24 2010 Epub)
- 3 **Wieser A.**, Schubert S.
Multi-epitope Vaccine against Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli (ExPEC)
Nova Acta Leopoldina NF 98, Nr.359:105-109 (2008)

Kongressbeteiligungen:

- 2010 **Vortrag**, dritte gemeinsame Tagung der Deutschen Gesellschaft für Mikrobiologie und Hygiene (DGHM) und Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) (Hannover, Deutschland)
- Vortrag**, 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Wien/Österreich)
- 2008 **Vortrag**, 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Meeting (Barcelona/Spanien)
- 2007 **Vortrag und Posterpräsentation**, *E.coli2007* (Kloster Banz, Deutschland)
- Posterpräsentation**, jährliches Treffen der Deutschen Gesellschaft für Mikrobiologie und Hygiene (DGHM) (Göttingen/Deutschland)
- 2006 **Posterpräsentation**, internationaler 2nd FEMS-Congress ("Federation Of European Microbiological Society") in Madrid/Spanien

Andere Publikationen:

Originalpublikationen:

- 1 **Wieser A***, Guggenberger C*, Pritsch M, Heesemann J, Schubert S
A novel ex vivo setup for dynamic long-term characterisation of processes on mucosal membranes by confocal imaging and simultaneous cytokine measurements (manuscript in pre-submission 2010);
- 2 Schubert S, Nörenberg D, Clermont O, Magistro G, **Wieser A**, Romann E, Hoffmann C, Weinert K, Denamur E
Prevalence and phylogenetic history of the TcpC virulence determinant in Escherichia coli **International Journal of Medical Microbiology** (accepted 2010)

- 3 Schubert S, Darlu P, Clermont O, **Wieser A**, Magistro G, Hoffmann C, Weinert K, Tenailon O, Matic I, Denamur E.
Role of intraspecies recombination in the spread of pathogenicity islands within the Escherichia coli species. PLoS Pathogen 2009 Jan;5(1):e1000257
- 4 Cirl C, **Wieser A**, Yadav M, Duerr S, Schubert S, Fischer H, Stappert D, Wantia N, Rodriguez N, Wagner H, Svanborg C, Miethke T.
Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins; Nature Medicine 2008 Apr;14(4):399-406

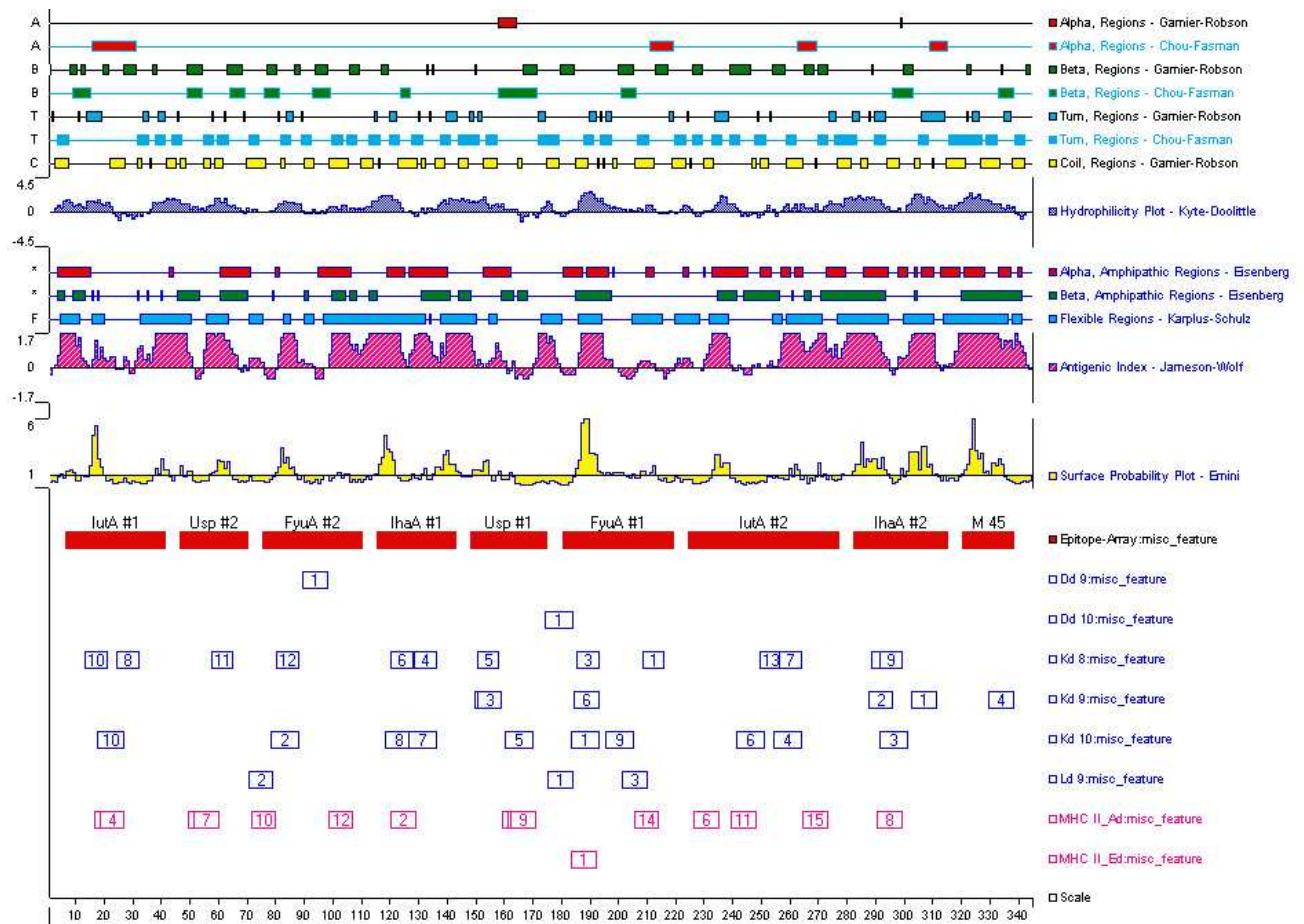
Kongressbeteiligungen:

- 2009 **Posterpräsentation (2x Co-Autor)**, Kongress der *Deutschen Gesellschaft für Mikrobiologie und Hygiene (DGHM)* (Göttingen/Deutschland)
- 2006 **Posterpräsentation (Co-Autor)**, *2nd FEMS-Congress* (“*Federation Of European Microbiological Society*”), Madrid/Spanien

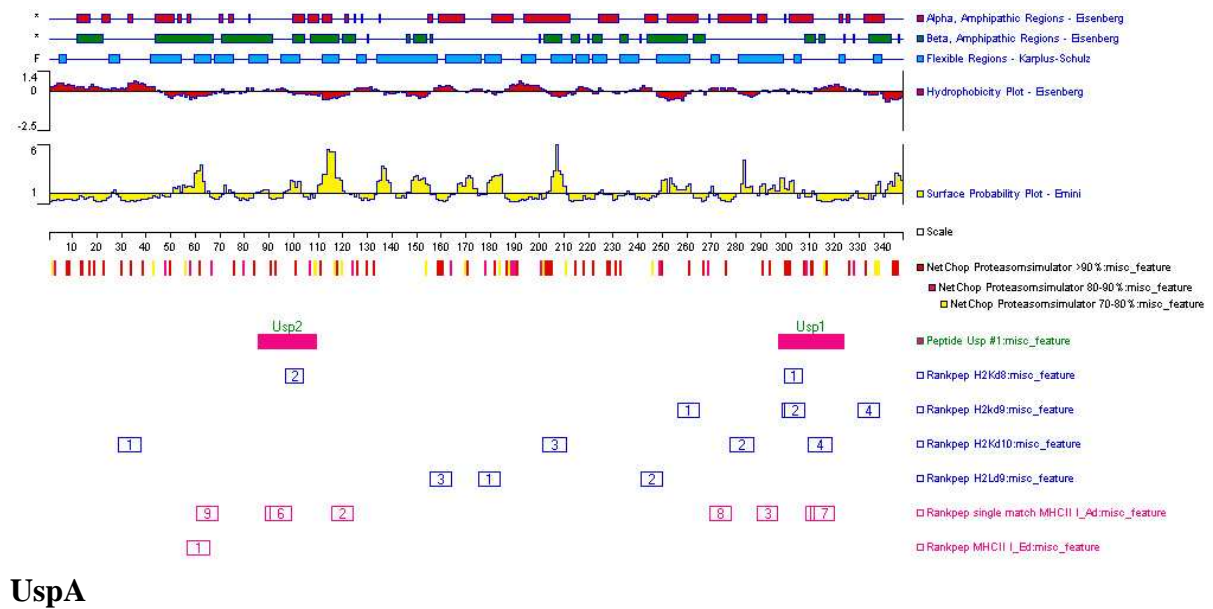
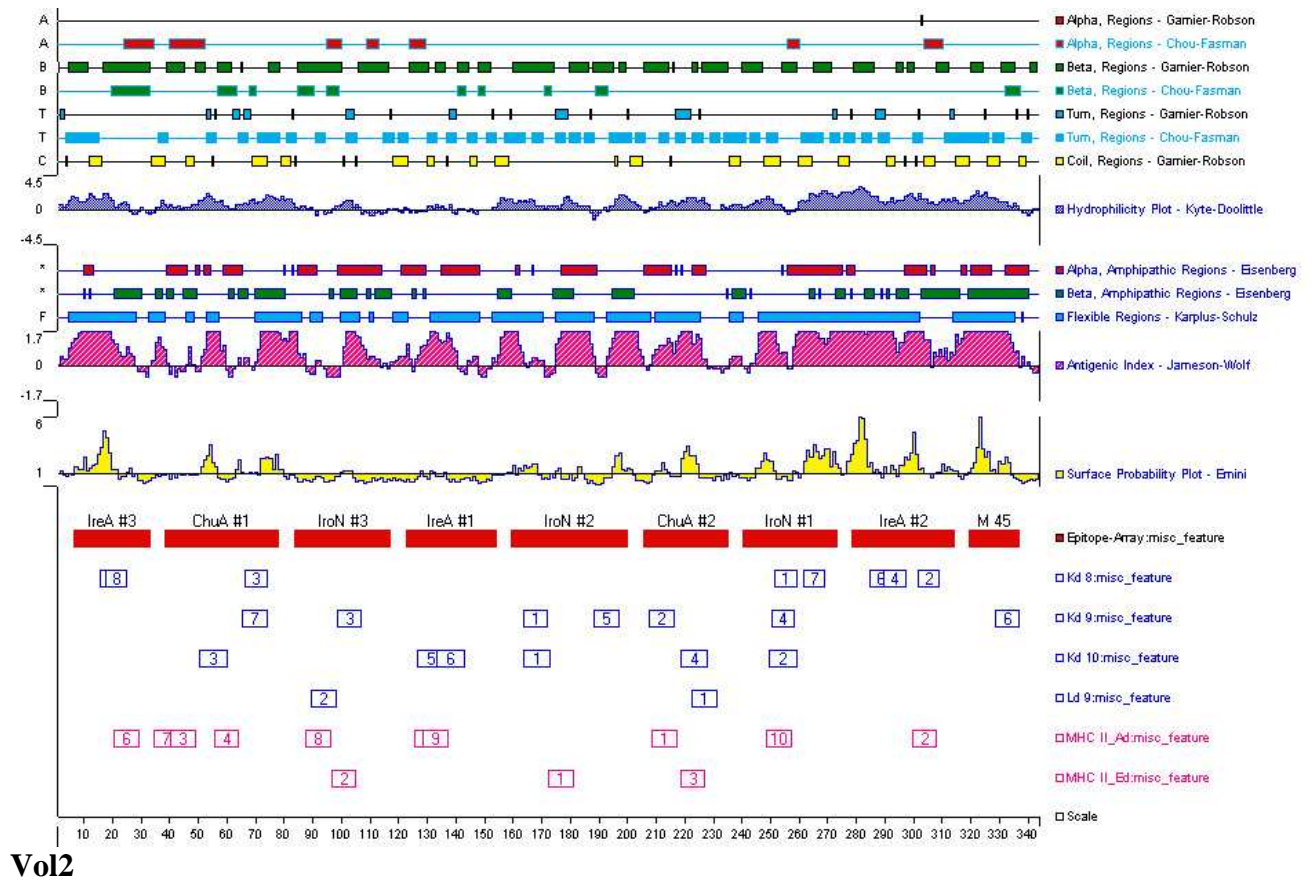
München, den

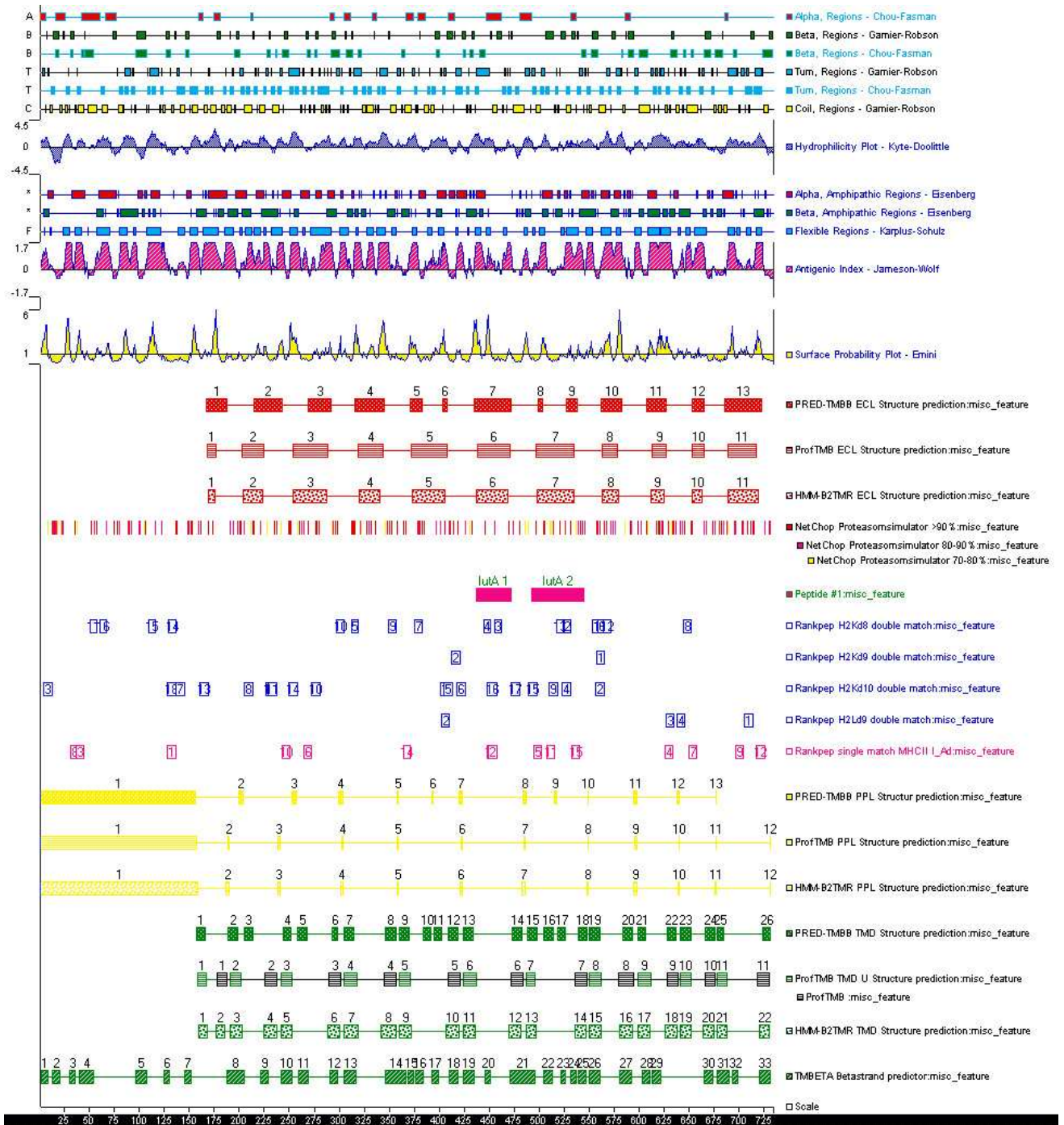
ANHANG

Anhang I Proteinstruktur und Proteasomenschnittmuster

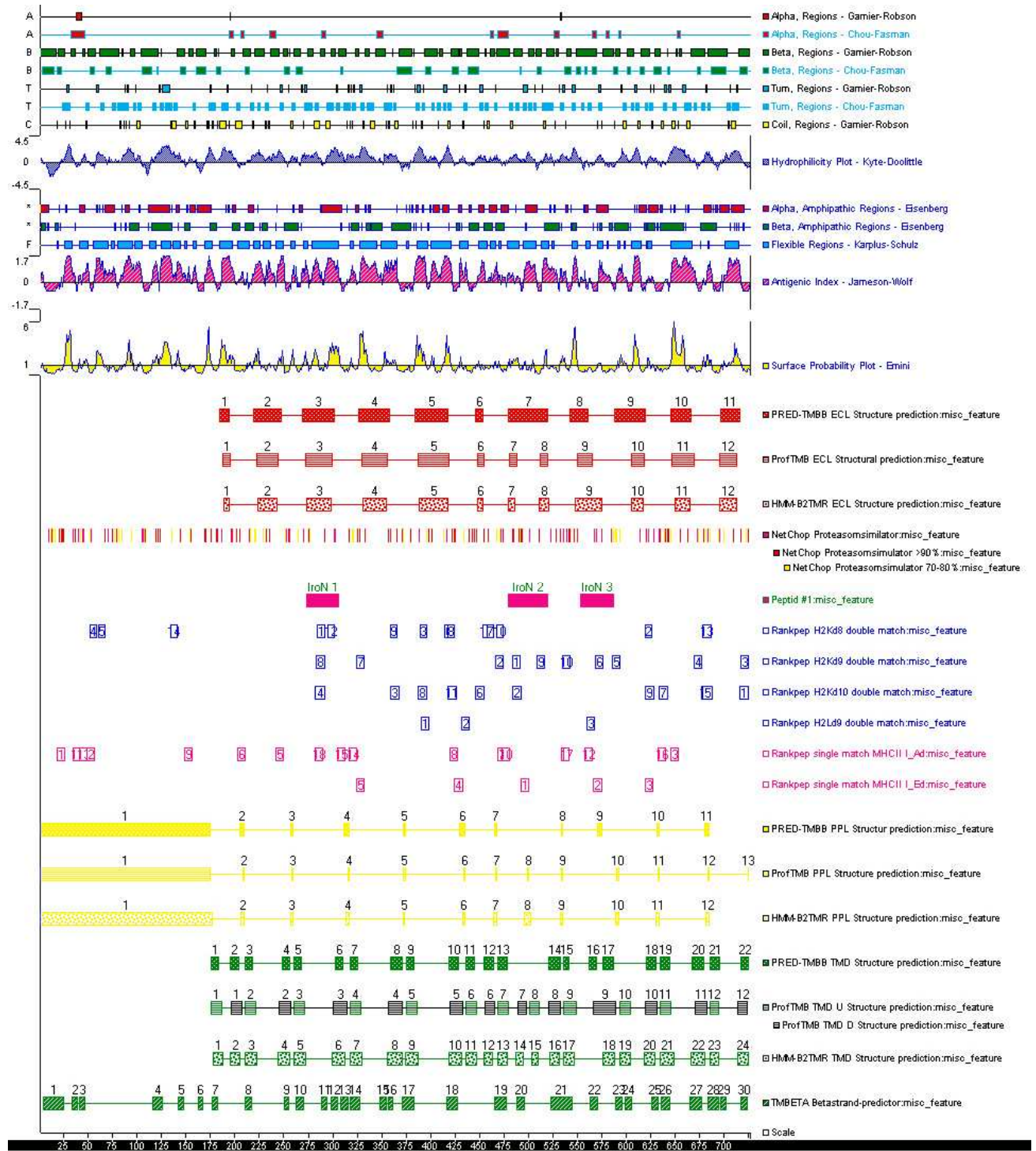


Vol1

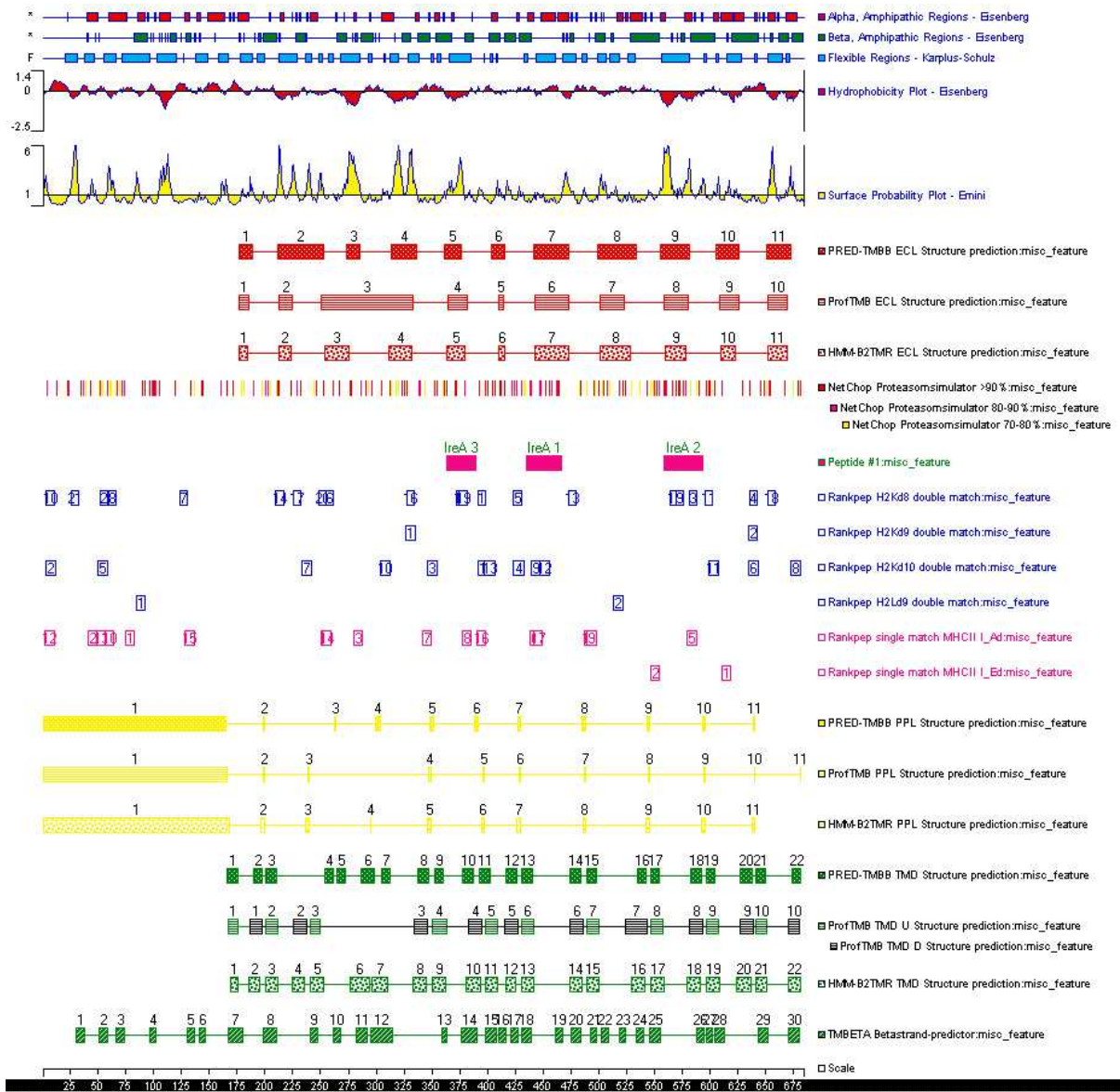




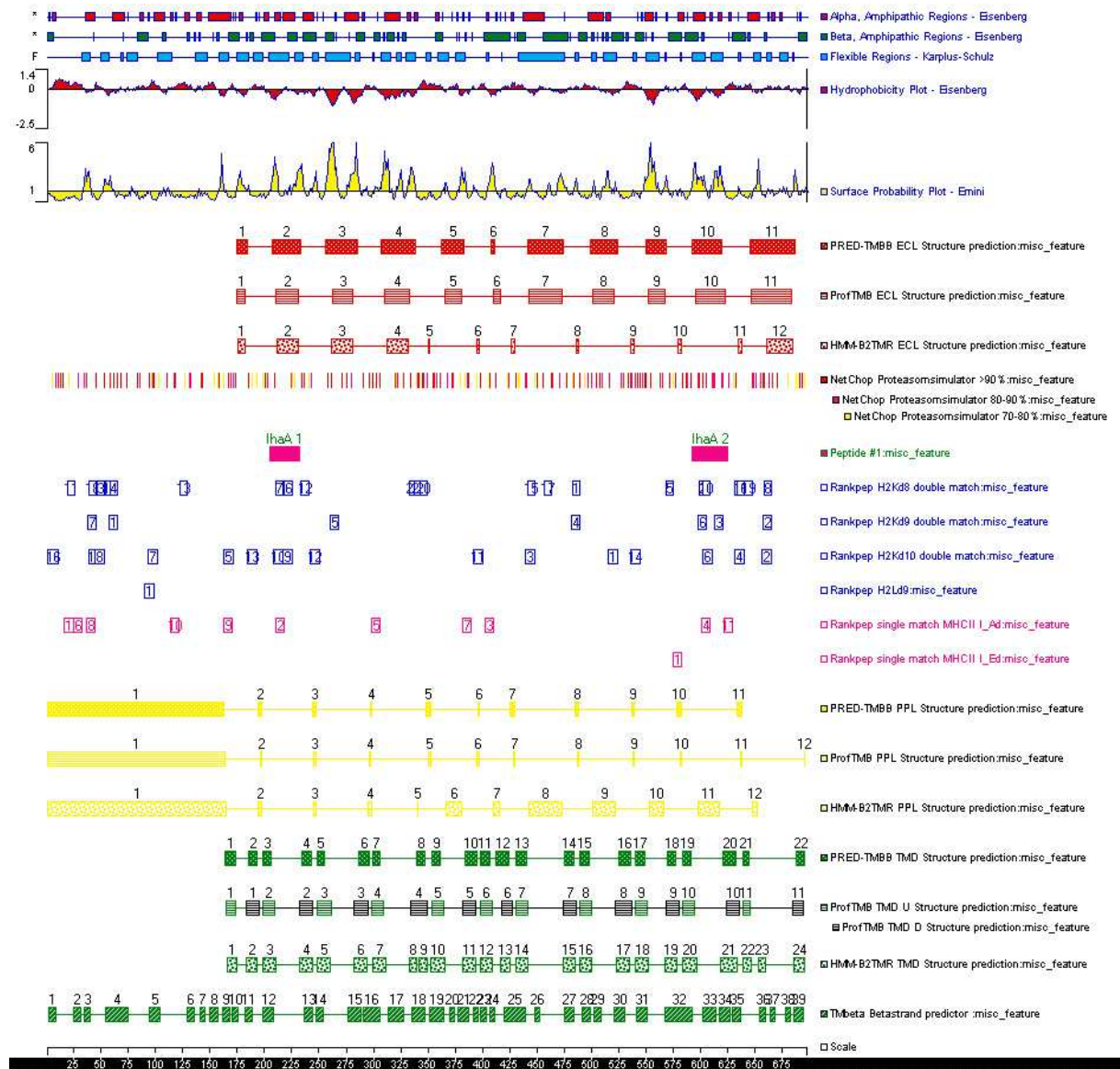
IutA



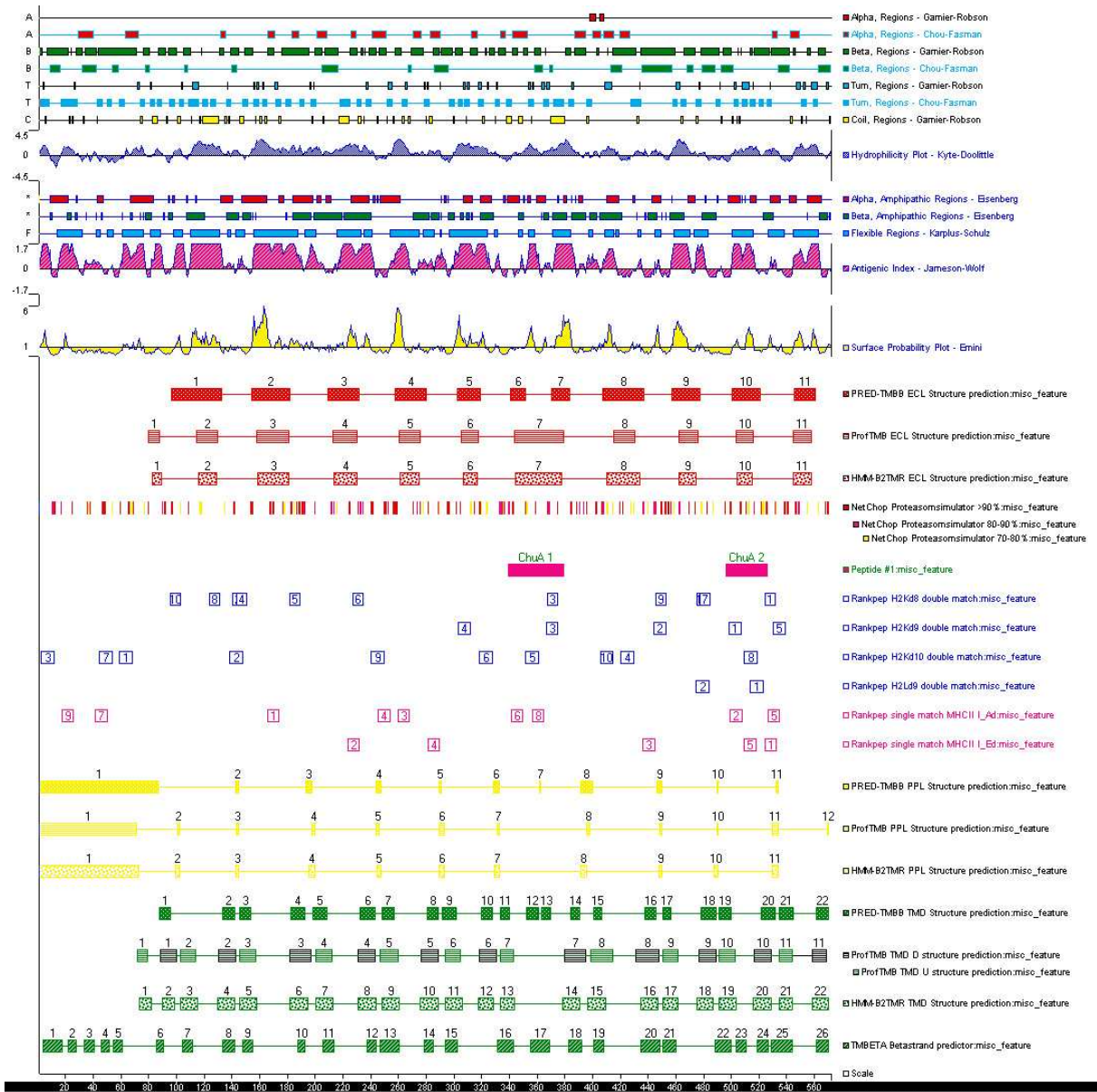
IroN



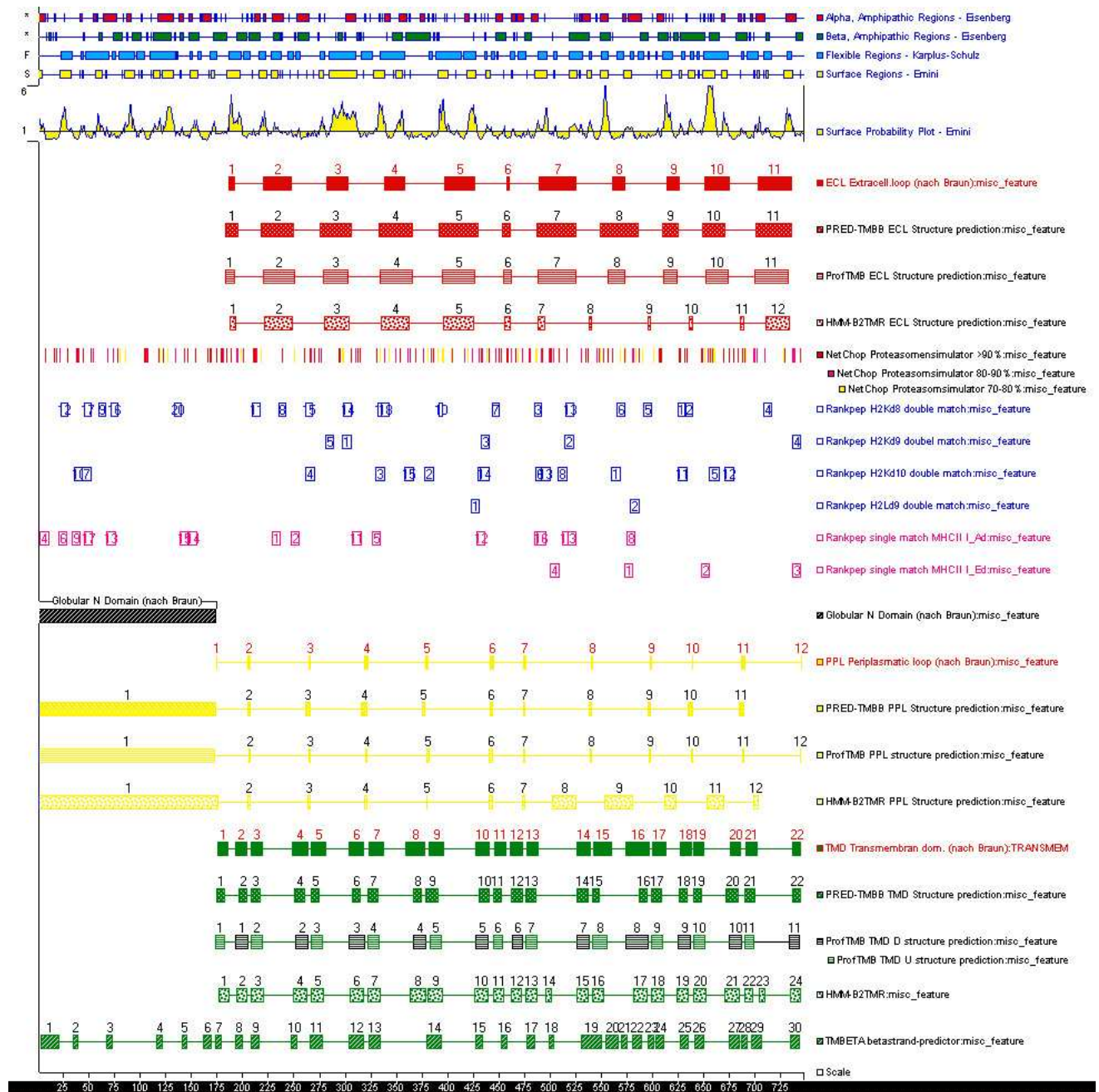
IreA



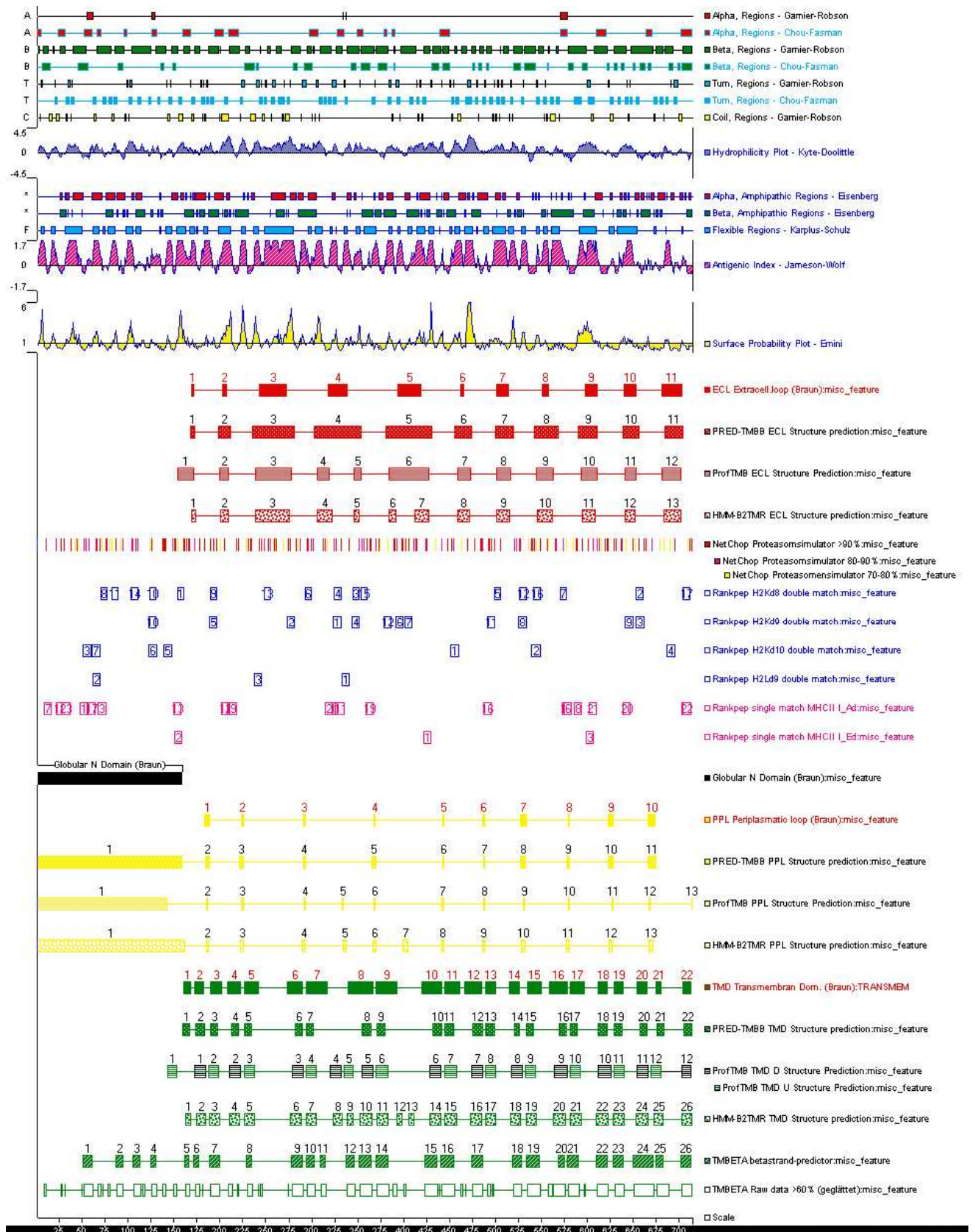
IhaA



Chua



FepA



FhuA

Anhang II Sequenzanalyse der synthetischen Gene

| AS | Codon | AS nach Codon Voll1: | | Voll2: | |
|----------------|-------|----------------------|----|--------|----|
| Alanin | gca | 23 | 7 | 21 | 5 |
| | gcc | | 3 | | 6 |
| | gcg | | 9 | | 5 |
| | gcu | | 4 | | 5 |
| Arginin | aga | 15 | 0 | 18 | 0 |
| | agg | | 0 | | 0 |
| | cga | | 1 | | 2 |
| | cgc | | 8 | | 8 |
| | cgg | | 0 | | 1 |
| | cgu | | 6 | | 7 |
| Asparagin | aac | 12 | 10 | 17 | 12 |
| | aau | | 2 | | 5 |
| Asparaginsäure | gac | 15 | 11 | 16 | 6 |
| | gau | | 4 | | 10 |
| Cystein | ugc | 0 | 0 | 2 | 1 |
| | ugu | | 0 | | 1 |
| Glutamin | cag | 17 | 14 | 12 | 8 |
| | caa | | 3 | | 4 |
| Leucin | cua | 18 | 0 | 20 | 0 |
| | cuc | | 3 | | 0 |
| | cug | | 13 | | 17 |
| | cuu | | 1 | | 1 |
| | uua | | 0 | | 0 |
| | uug | | 1 | | 2 |
| Glutaminsäure | gaa | 15 | 10 | 16 | 14 |
| | gag | | 5 | | 2 |
| Glycin | gga | 56 | 3 | 55 | 3 |
| | ggc | | 18 | | 22 |
| | ggg | | 0 | | 2 |
| | ggu | | 35 | | 28 |
| Lysin | aaa | 17 | 12 | 19 | 13 |
| | aag | | 5 | | 6 |
| Threonin | aca | 26 | 0 | 21 | 1 |
| | acc | | 13 | | 9 |
| | acg | | 4 | | 1 |
| | acu | | 9 | | 10 |
| Methionin | aug | 6 | 6 | 5 | 5 |
| Phenylalanin | uuc | 7 | 4 | 10 | 6 |
| | uuu | | 3 | | 4 |
| Histidin | cac | 6 | 4 | 3 | 2 |
| | cau | | 2 | | 1 |
| Prolin | cca | 32 | 3 | 31 | 9 |
| | ccc | | 3 | | 1 |
| | ccg | | 19 | | 17 |
| | ccu | | 7 | | 4 |

| | | | | | |
|-------------------|-----|----|----|----|----|
| Isoleucin | aua | 10 | 0 | 14 | 0 |
| | auc | | 6 | | 12 |
| | auu | | 4 | | 2 |
| Serin | agc | 23 | 5 | 32 | 9 |
| | agu | | 0 | | 1 |
| | uca | | 1 | | 0 |
| | ucc | | 9 | | 11 |
| | ucg | | 2 | | 3 |
| | ucu | | 6 | | 8 |
| Tryptophan | ugg | 2 | 2 | 3 | 3 |
| Tyrosin | uac | 22 | 13 | 17 | 13 |
| | uau | | 9 | | 4 |
| Valin | gua | 21 | 2 | 10 | 2 |
| | guc | | 4 | | 1 |
| | gug | | 6 | | 4 |
| | guu | | 9 | | 3 |
| <i>Stop-Codon</i> | uaa | 1 | 1 | 1 | 1 |

| | | | | | |
|--|---------------|-----|--------------|-----|--|
| | Codons Voll1: | 344 | Codons Vol2: | 343 | |
|--|---------------|-----|--------------|-----|--|

Basenzusammensetzung der Gene:

| Base: | Voll1, Gehalt und Absolut: | | Vol2, Gehalt und Absolut: | |
|------------|----------------------------|-----|---------------------------|-----|
| A-Gehalt: | 21,71% | 224 | 23,42% | 241 |
| G-Gehalt: | 28,49% | 294 | 27,41% | 282 |
| T-Gehalt: | 20,74% | 214 | 20,41% | 210 |
| C-Gehalt: | 29,07% | 300 | 28,77% | 296 |
| GC Gehalt: | 57,56% | | 56,18% | |

| Parameter: | Voll1: | Vol2: |
|---|-------------|-------------|
| Molekularmasse: | 36172.11 Da | 36116.96 Da |
| Gesamtlänge in AS-Resten | 343 | 342 |
| stark basische AS: Lys, Arg | 32 | 37 |
| stark saure AS: Asp, Glu | 30 | 32 |
| hydrophobe AS: Ala, Ile, Leu, Phe, Trp, Val | 81 | 78 |
| polare AS: Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr | 100 | 101 |
| isoelektrischer Punkt: pH: | 8.571 | 8.941 |
| Ladung bei pH 7,0: | 2.920 | 5.364 |

Anhang III Gensequenzen der synthetischen Gene

Vol1 Sequenz:

CTCGGATCCAACCGCGTGGACGACTTTATTGATTACACTCAGCAGCAGAAAATTGCAGC
GGGCAAAGCTATCTCGGCGGACGCAATCCCGGGTGGCTCTGTAGATTATGACAATGGCC
CTGGTCCGGGTGGCAAACCGCAAGTATACGGCGTCCATACTGGTGAGGGCACCCTTAC
GAAAACGTTTCGCGTCGCCAACATGGGTCCCTGGTCCGGGAGCGGCGACGTTTTATACCA
CACTAAAGACATGCAGCTTTACTCCGGTCCGGTTGGCATGCAGACTCTGAGCAACGCGG
GTAAGGCGGACGCGACTGGTGTGCAAGGCCCGGGTCCGGGTTCTACGCAGCAGCGCCAG
GGTTCCTCCGTGACCTCCTTGAGCGACACCGCAGCAACGCGCATTCCCTATCCTACCGAG
TCCCAGGGTCCGGGTCCCGGTGAAGGTTACTATTATGGCCCCGAACGAAATCGTTAAGAA
ATTCCAAATCCACCACGTTGTGGCTATTGAACATGGAGGTGGCGGTCCGGGTCCGGGTG
TTTTTGGTCTGTACCGTCAAACACCCGCGAAAAGCTGAATAGCGCATATAACATGCCG
ACGATGCCGTATCTGTCTTCCACTGGTTATACTACCGCCGAAACCCTCGCGGCATACGGC
CCGGTCTTGGCTTCAGCCAGGGCGTGGCACTGCCTGACCCAGGTAAATACTATGGTTCG
CGGTATCTACGGCGCTGCGGTCAACGGTACCTGCCGCTACCAAATCTGTTAACGTTTC
GGACTCCAAGCTGGAAGGTGTTAAAGTGGATAGCTACGAGCTGGGCTGGCGTGGCCCCG
GTCCGGGCCGTGGTAAACTCCGCGCTTACCCAGAACTACTCATCTCTGTCTGTCTGTTCA
GAAAAGGTGTACGACGAGAAAGGTGAGTACCTGAAAGCCTGGACTGGTCCGGGCCAG
GTATGGATCGTTCCCGTGACCGTCTGCCTCCATTCGAAACCGAAACCCGCATCCTGCTCCA
GCTGCAGTAAGGTACCGTTCGAC

Vol2 Sequenz:

CTCGGATCCCTGCGTGACGATAGCGCCACTGGTAAAAAGACTACTGAAACTCAAAGCG
TATCTATCAAACAGAAAGCGGTGTTTATCGAAGGTCCTGGCCCAGGCTATGCACAGGC
CTTTCGCGCTCCTACCATGGGTGAGATGTACAATGATTCTAAGCATTCTCTATCGGTCG
CTTCTACACAACTACTGGGTTCCGAACCCAAACCTGCGGCCAGAACTGGCCCCGGGTC
CTGGCGGCGACAACGTAATTGGTCAGACCGCTTCGGGTGCGTACATCCTGAAATGGCAA
AACGGCGGCAAAGCTCTGGTGGATGGTATCGAAGCGTCTATGTCGTTTGGTCCAGGCC
GGGTGGTATCGCCAAAGCATTTCGTGCCCCGTCCATCCGTGAAGTGTCCCCGGGGTTCG
GTACTCTGACCCAGGGTGGTGCTAGCATCATGTACGGCAATGGCCCCGGGCCGGTAAA
GCACCCAACCTGTACCAATCCTCGGAAGGTTACCTGTTGTATTCCAAAGGTAACGGTTG
TCCGAAAGATATCACCTCTGGGGGCTGCTACCTGATCGGCAATAAGGACCTGGACCCAG
AAGGTCCGGGTCCCTGGCGTCGGAACCTTCGCGGACCGCAGCACTCACATTAGTTCTTCT
ATAGCAAACAGCCGGGTTACGGAGTTAACGATTTCTACGTTTCCCTACGGTCCGGGCCCA
GGCAATATCTATGCTGGTGATACTCAAATTCCTCCTCCAGCGCCGTGACCGAATCTCTG
GCCAAGAGCGGCAAAGAAACCAACCGCCTGTACCGCCAGAACGGCCCCGGGCCGGGTC
GCCGCAAAGCGATGATGAATCCCTGAACGGCAAGTCCCTTAAGGGCGAGCCGCTGGA
ACGTACCCCGCGTCACGCGGCAAACGCAAACTGGAATGGGACTACACTGGCCCAGGTC
CAGGTATGGATCGTAGCCGAGATCGTCTGCCACCGTTCGAAACTGAAACGCGCATCCTGT
TGCAGCTGCAGTAAGGTACCGTTCGAC

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Literatur angefertigt habe. Die notwendigen Versuche wurden wie beschrieben von mir durchgeführt.

Die Bearbeitung der Thematik wurde von PD Dr. Sören Schubert betreut und durch Herrn Dr. Dr. Jürgen Heesemann angeleitet.

Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form andernorts oder zu einem anderen Zweck als ausschließlich als Dissertation zur Erlangung des Akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.) der Medizinischen Fakultät der Ludwigs Maximilians-Universität (LMU) in München eingereicht.

München, den

.....

Andreas Wieser